

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΑΘΗΝΩΝ



ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΤΗΝ

«ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ»

**«In vitro μελέτες διαπερατότητας διαδερμικών συστημάτων  
Νιτρογλυκερίνης και Νικοτίνης διαμέσου της ανθρώπινης  
κεράτινης στιβάδας και της μεμβράνης Strat-M™»**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΑΣΗΜΟΠΟΥΛΟΥ-ΜΑΡΙΝΟΥ

ΑΘΗΝΑ

2017

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Παρασκευάς Δάλλας, Επίκουρος Καθηγητής-Επιβλέπων

Δημήτριος Μ. Ρέκκας, Αναπληρωτής Καθηγητής

Γεωργία Βαλσαμή, Αναπληρώτρια καθηγήτρια

## **THREE-MEMBERED EXAMINATION COMMITTEE**

Paraskevas Dallas, Assistant Professor –Supervisor

Dimitrios M. Rekkas, Associate Professor

Georgia Valsami, Associate Professor

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια του Τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Με το πέρας της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Παρασκευά Δάλλα για την πολύτιμη αρωγή του και το συνεχές ενδιαφέρον σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.
- Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Ρέκκα για τις χρήσιμες επισημάνσεις και συμβουλές του σε όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της μελέτης μου.
- Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Γεωργία Βαλσαμή για την επεξεργασία των in vivo δεδομένων και την πολύτιμη βοήθειά της.
- Την κ. Μαρία Βατμανίδου, διδάκτορα, για τις συμβουλές και τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε.
- Τον κ. Σπυρίδων Γκίνη, μεταπτυχιακό φοιτητή, για το κλίμα συνεργασίας, κατανόησης και αλληλοβοήθειας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η διαδερμική οδός προσφέρει μερικά ευδιάκριτα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές οδούς χορήγησης. Τα φαρμακευτικά προϊόντα που εφαρμόζονται στο δέρμα για συστηματική δράση αναφέρονται ως διαδερμικά συστήματα. Απαραίτητο στάδιο της φαρμακευτικής ανάπτυξης νέων υποψήφιων φαρμακομορίων είναι οι προκλινικές δοκιμές, οι οποίες περιλαμβάνουν αξιολόγηση του κινδύνου και θεραπευτική εκτίμηση των ουσιών, και κυμαίνονται από *in vivo* συστήματα έως τις απλές *in vitro* μεθόδους. Η εγκαθίδρυση μιας *in vitro*–*in vivo* συσχέτισης, με την ικανότητα να προβλέπει με αξιοπιστία και ακρίβεια τα *in vivo* χαρακτηριστικά της βιοδιαθεσιμότητας μέσα από τα *in vitro* χαρακτηριστικά αποδέσμευσης, έχει πολύ μεγάλη σημασία στη διασφάλιση της ποιότητας του προϊόντος, στον καθορισμό του φαρμακολογικού, φαρμακοκινητικού και τοξικολογικού αποτελέσματος του φαρμάκου και στην επιβεβαίωση του κύριου μηχανισμού δράσης του. Μάλιστα, σε περιπτώσεις όπου υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ *in vitro* και *in vivo* δεδομένων, τα *in vitro* πειράματα δύναται να υποκαταστήσουν τις *in vivo* δοκιμασίες που διεξάγονται σε μελέτες βιοϊσοδυναμίας.

Πρώτα διεξάγονται οι *in vitro* μέθοδοι, ως μέρος μιας ιεραρχικής στρατηγικής δοκιμών, συμπληρώνοντας τις *in vivo* έρευνες που διεξάγονται αργότερα σε ζώα ή ανθρώπους. Οι συσκευές διάχυσης θεωρούνται ως το πιο έγκυρο *in vitro* μοντέλο για την αξιολόγηση της διείσδυσης ουσιών μέσω του δέρματος και, ως επί το πλείστον, χρησιμοποιείται ανθρώπινο απομονωμένο δέρμα ως μεμβράνη στα *in vitro* πειράματα διαπέρασης. Ωστόσο, το ανθρώπινο δέρμα παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς, όπως το κόστος, η ευαισθησία στις συνθήκες αποθήκευσης, η υψηλή μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων και η περιορισμένη διαθεσιμότητα. Για αυτό το λόγο, είναι απαραίτητη η εύρεση μίας εμπορικά συνθετικής μεμβράνης η οποία θα μιμείται το ανθρώπινο δέρμα και θα μπορεί να αξιολογήσει τη διείσδυση υποψηφίων τοπικών ή διαδερμικών φαρμάκων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της τεχνητής μεμβράνης Strat-M™ (Merck Millipore, USA), ως υποκατάστατο του δέρματος στις *in vitro* μελέτες διάχυσης, και η εγκαθίδρυση *in vitro*–*in vivo* συσχετίσεων. Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαπέρασης εμπορικών διαδερμικών θεραπευτικών συστημάτων νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης διαμέσου της μεμβράνης Strat-M™ και

ανθρώπινης κεράτινης στιβάδας, που ελήφθη από πλήρες δέρμα με τη μέθοδο θερμικού διαχωρισμού, σε τροποποιημένα Franz κύτταρα. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι παρότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση των αποτελεσμάτων διαπέρασης από τη μεμβράνη Strat-M™, με ικανοποιητικούς συντελεστές συσχέτισης  $R^2$ , με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του δέρματος, επιτυγχάνεται σημαντικά υψηλότερη ροή με τη χρήση της Strat-M™, συγκριτικά με το δέρμα, και υπερεκτιμάται η in vitro διαδερμική διαπέραση.

Όσον αφορά την εγκαθίδρυση in vitro–in vivo συσχετίσεων, τα in vitro αποτελέσματα διαπέρασης συσχετίστηκαν με τα in vivo αποτελέσματα απορρόφησης, τα οποία προέκυψαν με τη μέθοδο της αποσυνέλιξης από βιβλιογραφικά δεδομένα επιπέδων φαρμάκου στο αίμα έπειτα από διαδερμική και ενδοφλέβια χορήγηση. Τα πειραματικά δεδομένα των in vitro–in vivo συσχετίσεων έδειξαν ότι υπάρχει γραμμική σχέση, με ικανοποιητικούς συντελεστές συσχέτισης  $R^2$ , μεταξύ των in vitro αποτελεσμάτων διαπέρασης του δέρματος και της Strat-M™ και των in vivo δεδομένων, και ενδεχομένως να μπορεί να εκτιμηθεί η συμπεριφορά του φαρμάκου in vivo μέσα από τα in vitro πειράματα διαπέρασης τόσο με τη χρήση της ανθρώπινης επιδερμίδας όσο και της συνθετικής μεμβράνης Strat-M™ και να εγκαθιδρυθεί η in vitro- in vivo συσχέτιση σε μελέτες βιοϊσοδυναμίας.

*Λέξεις κλειδιά:* Διαδερμική χορήγηση, Νικοτίνη, Νιτρογλυκερίνη, in vitro διαπερατότητα, Κεράτινη στιβάδα, μεμβράνη Strat-M™, in vitro–in vivo συσχέτιση

## ABSTRACT

Transdermal drug delivery systems offer clear pharmacological advantages over conditional routes of administration. A crucial step in pharmaceutical drug development is the preclinical safety testing of new drug candidates, which include risk assessment of chemicals and the therapeutic assessment of topical drug delivery systems, and range from in vivo systems to simple in vitro methods. The establishment of an in vitro-in vivo correlation that is able to reliably and accurately predict the in vivo bioavailability through the in vitro release of drug is critical in determining the pharmacological, pharmacokinetic and toxicological effect of the drug and ensuring product quality. Indeed, in cases where there is a clear correlation between in vitro and in vivo data, the in vitro experiments may replace the in vivo tests in bioequivalence studies.

The in vitro methods, as a part of a hierarchical strategy of trials, are commonly used prior to in vivo human or animal studies. The diffusion cells are considered as the most valid in vitro model for the assessment of percutaneous absorption, and usually, isolated human skin is the membrane of choice in in vitro permeation experiments. However, human cadaver skin presents a number of drawbacks, such as limited availability, high cost, storage limitations and high variability results. Therefore, the discovery of a commercial synthetic membrane that mimics human skin has become increasingly important in the evaluation of local or transdermal drug penetration behavior.

The focus of this study was the evaluation of the artificial Strat-M membrane (Merck Milipore, USA) as an alternative to human skin in in vitro diffusion studies of commercial transdermal therapeutic systems of nitroglycerin and nicotine, as well as an establishment of in vitro-in vivo correlation. In this context, permeation experiments were conducted in modified Franz cells using Strat-M™ membrane and human stratum corneum as barrier. The latter was obtained from whole skin by the heat-separation technique. The experimental data showed that there is a linear correlation, with satisfying correlation coefficient  $R^2$ , between the permeation results of Strat-M™ membrane and human skin. However, a significant higher flux was achieved using the Strat-M™, compared to the excised skin, and the in vitro transdermal permeation of both nicotine and nitroglycerin was overestimated. With

regard to the establishment of the in vitro-in vivo correlation, the in vitro permeation results were associated with the in vivo absorption profiles, after transdermal application, obtained using the deconvolution method. The in vitro skin and Strat-M™ permeation results had a linear correlation, with satisfying correlation coefficients  $R^2$ , with the in vivo data, and hence, it may be possible to assess the in vivo absorption of drugs through the in vitro permeation experiments with the use of human skin and the synthetic membrane Strat-M™, as well as establishing the in vitro-in vivo correlation in bioequivalence studies.

Key words: Transdermal administration, Nicotine, Nitroglycerin, in vitro permeation, human stratum corneum, Strat-M™ membrane, in vitro-in vivo correlation

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	σελ.2
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	σελ.3
<b>ABSTRACT</b>	σελ.5
<b>A.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	σελ.10
1. ANATOMIA ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	σελ.10
1. Εισαγωγή	σελ.10
1.1 Δομή δέρματος	σελ.10
1.1.1 Επιδερμίδα	σελ.11
1.1.1.1 Βασική στιβάδα	σελ.12
1.1.1.2 Ακανθωτή στιβάδα	σελ.13
1.1.1.3 Κοκκιώδης στιβάδα	σελ.13
1.1.1.4 Κεράτινη στιβάδα	σελ.13
1.1.2 Κυρίως δέρμα ή χόριο	σελ.14
1.1.3 Υποδόριος ιστός	σελ.15
1.2 Εξαρτήματα δέρματος	σελ.15
1.3 Λειτουργία δέρματος	σελ.16
1.4 Διαδερμική διαπερατότητα	σελ.17
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση	σελ.20
1.6 Κινητική της διαδερμικής απορρόφησης	σελ.21
1.6.1 Θεωρία της διάχυσης	σελ.21
1.6.2 Νόμοι διάχυσης	σελ.21
1.6.3 Παράγοντες που καθορίζουν τη διαδερμική διάχυση	σελ.24
1.7 Τοπικές φαρμακοτεχνικές μορφές	σελ.25
2. ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ	σελ.26
2.1 Εισαγωγή	σελ.26
2.2 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα διαδερμικής χορήγησης	σελ.28
2.3 Βασικά συστήματα διαδερμικής χορήγησης	σελ.30
2.3.1 Συστήματα στα οποία το φάρμακο ενσωματώνεται στο συγκολλητικό (DIAPs)	σελ.31
2.3.2 Συστήματα τύπου μήτρας (Matrix Systems)	σελ.31
2.3.3 Συστήματα τύπου δεξαμενής (Reservoir Systems)	σελ.32
2.3.4 Μικρο-διαμερισματοποιημένα συστήματα (microreservoir patches)	σελ.32



2.4 Επιθυμητά χαρακτηριστικά διαδερμικών συστημάτων	σελ.33
2.5 Διαδερμικό σύστημα νικοτίνης	σελ.34
2.6 Διαδερμικό σύστημα νιτρογλυκερίνης	σελ.35
3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ	σελ.37
3.1 Εισαγωγή	σελ.37
3.2 In vitro μέθοδοι	σελ.40
3.2.1 Κύτταρα διάχυσης (diffusion cells)	σελ.40
3.2.1.1 Στατικά κύτταρα διάχυσης (static diffusion cells)	σελ.40
3.2.1.2 Κύτταρα συνεχούς ροής (flow through diffusion cells)	σελ.44
3.2.2 Τεχνική tape-stripping	σελ.46
3.2.3 Τεχνική μικροδιάλυσης	σελ.47
3.2.4 Τεχνική ATR-FTIR	σελ.49
3.2.5 Μέθοδος PAMPA	σελ.51
3.2.6 USP Μέθοδοι	σελ.52
3.2.6.1 Συσκευή περιστρεφόμενου πτερυγίου με δίσκο (USP apparatus V)	σελ.53
3.2.6.2 Συσκευή περιστρεφόμενου κυλίνδρου (USP apparatus VI)	σελ.54
3.2.6.3 Συσκευή παλινδρομικού στηρίγματος (USP apparatus VII)	σελ.55
3.3 Μembrάνη επιλογής	σελ.56
3.3.1 Μembrάνη ανθρώπινου δέρματος	σελ.57
3.3.2 Μembrάνη ζωικού δέρματος	σελ.60
3.3.3 Τεχνητές μεμβράνες	σελ.61
3.3.3.1 Τεχνητές μεμβράνες ποιοτικού ελέγχου	σελ.62
3.3.3.2 Τεχνητές μεμβράνες προσομοίωσης του δέρματος	σελ.65
3.3.3.3 STRAT-M™ μεμβράνη	σελ.68
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	σελ.71
<b>B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	σελ.72
1.1 Υλικά, όργανα και συσκευές	σελ.72
1.1.1 Υλικά	σελ.72
1.1.2 Όργανα και συσκευές	σελ.73
1.2 Μέθοδοι	σελ.74
1.2.1 Φάσμα UV	σελ.74
1.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	σελ.75
1.2.2.1 Συνθήκες ανάλυσης	σελ.75
1.2.2.2 Παρασκευή κινητής φάσεως	σελ.76

1.2.2.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων	σελ.77
1.2.2.4 Έλεγχος γραμμικότητας μεθόδου ανάλυσης	σελ.78
1.2.2.5 Έλεγχος πιθανών παρεμποδίσεων στις χρωματογραφικές κορυφές	σελ.78
1.2.2.6 Προσδιορισμός διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα	σελ.78
1.2.3 In vitro πειράματα μελετών διαπέρασης διαμέσου του δέρματος και της StratM	σελ.78
1.2.3.1 Παρασκευή διαλύματος υποδοχέα	σελ.79
1.2.3.2 Μembrάνη επιλογής	σελ.79
1.2.3.2.1 Ανθρώπινο δέρμα	σελ.79
1.2.3.2.2 Μembrάνη Strat-M™	σελ.80
1.2.3.3 Περιγραφή πειράματος διάχυσης	σελ.81
1.2.4 In vivo – In vitro συσχέτιση	σελ.82
1.2.4.1 Η μέθοδος της αποσυνέλιξης (Deconvolution method)	σελ.82
<b>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	σελ.83
1.1 Φάσμα UV	σελ.83
1.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	σελ.83
1.2.1 Χρωματογράφημα των υπό εξέταση ουσιών	σελ.83
1.2.2 Έλεγχος πιθανών παρεμποδίσεων στις χρωματογραφικές κορυφές	σελ.85
1.3 Έλεγχος γραμμικότητας της μεθόδου ανάλυσης	σελ.86
1.4 Μελέτες διαλυτότητας	σελ.87
1.5 In vitro μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας	σελ.88
1.6 In vitro – In vivo Συσχετίσεις	σελ.96
<b>Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	σελ.99
1.1 Τεχνητή μεμβράνη Strat-M™ στα in vitro πειράματα	σελ.99
1.2 Μembrάνη ανθρώπινου δέρματος στα in vitro πειράματα	σελ.99
1.3 In vitro – in vivo Συσχετίσεις	σελ.99
<b>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	σελ.101

# Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

#### 1. Εισαγωγή

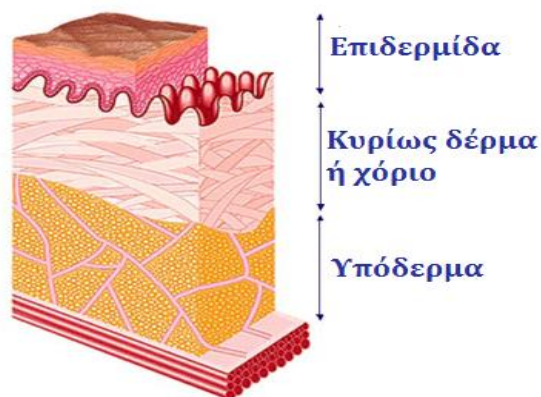
Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος, με ιδιαίτερα σημαντικές αμυντικές και αισθητήριες λειτουργίες. Περιβάλλει εξωτερικά το σώμα και κάνει αισθητά τα ερεθίσματα του εξωτερικού περιβάλλοντος.<sup>1</sup>

Το δέρμα συνίσταται σε ποσοστό 70% από νερό (το 13% του νερού του δέρματος βρίσκεται στην κεράτινη στιβάδα). Η επιφάνειά του δέρματος στον άνδρα είναι 1,8 cm<sup>2</sup> και στη γυναίκα 1,6 cm<sup>2</sup>. Το βάρος του, χωρίς το υπόδερμα, ανέρχεται σε 5,8% και μαζί με αυτό σε 30-32% του βάρους ολόκληρου του σώματος. Αυτό σημαίνει πως για ένα μέσο βάρος σώματος 75 kg, το βάρος του δέρματος χωρίς το υπόδερμα ανέρχεται σε 4-6 kg, ενώ το βάρος ολόκληρου του δέρματος σε 22-24 kg.<sup>1</sup> Το δέρμα ποικίλει ανάλογα με τη μοίρα του σώματος από την οποία προέρχεται, το φύλο, την ηλικία, τη φυλή και τον τρόπο διαβίωσης.<sup>2</sup>

#### 1.1 Δομή δέρματος

Ως προς την κατασκευή, το δέρμα αποτελείται από της εξής στιβάδες<sup>3</sup> (Σχήμα 1):

1. Επιδερμίδα (epidermis)
2. Κυρίως δέρμα ή χόριο (dermis)
3. Υπόδερμα ή υποδόριο λίπος (hypodermis or subcutaneous fat)



Εικόνα 1<sup>4</sup>: Στιβάδες του δέρματος.

Η επιδερμίδα συνιστά την εξωτερική, επιθηλιακή στιβάδα και το χόριο την εσωτερική στιβάδα. Κάτω από το χόριο βρίσκεται το υπόδερμα το οποίο περιέχει άφθονο λίπος. Το δέρμα διαθέτει, επίσης, εξαρτήματα όπως τρίχες, νύχια, ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες τα οποία θα αναλύσουμε παρακάτω.<sup>5,6</sup>

### **1.1.1 Επιδερμίδα**

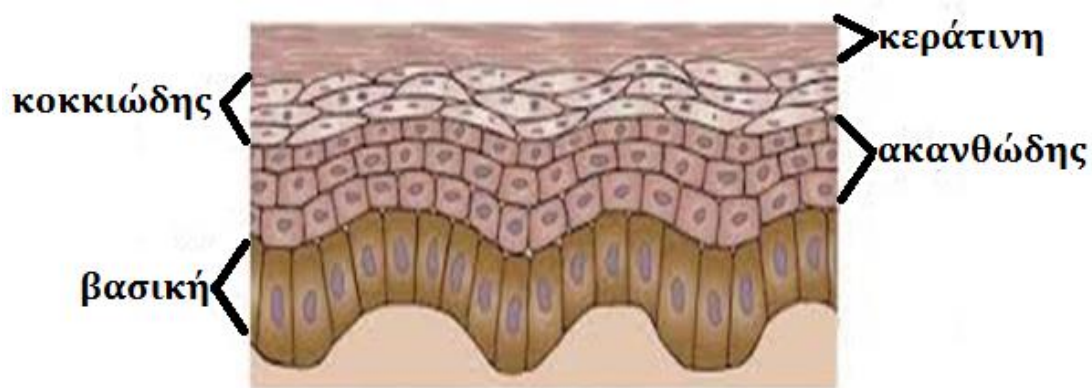
Η επιδερμίδα είναι ένα όργανο το οποίο δε διαθέτει αγγεία, ουσιαστικά τρέφεται από τα αγγεία που βρίσκονται στο χόριο, και υποβάλλεται σε ένα τακτικό μοτίβο πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και κερατινοποίησης.<sup>6</sup> Αποτελείται από ένα κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο, το οποίο δε συνδέεται οριζοντίως με το χόριο αλλά σχηματίζει προεκβολές προς αυτό, σχηματίζοντας το εξωτερικό στρώμα του δέρματος.<sup>7</sup>

Για πρακτικούς λόγους, η επιδερμίδα χωρίζεται σε δύο κύρια στρώματα, την κεράτινη στιβάδα και τη ζώσα επιδερμίδα. Η ζώσα επιδερμίδα αποτελείται από τη βασική, την ακανθωτή και την κοκκιώδη στιβάδα.<sup>6</sup>

Η επιδερμίδα διαθέτει δύο βασικούς τύπους κυττάρων, τα κερατινοκύτταρα ή αλλιώς επιθηλιακά κύτταρα και τα μη κερατινοποιημένα κύτταρα όπως τα μελανοκύτταρα, τα κύτταρα του Langerhans και τα κύτταρα του Merkel τα οποία όμως δε συμμετέχουν στη διαδικασία της κερατινοποίησης.<sup>7</sup> Βάσει των επιδερμικών κυττάρων της, λοιπόν, η επιδερμίδα διακρίνεται σε τέσσερις στιβάδες (Σχήμα 2), οι οποίες από μέσα προς τα έξω είναι οι εξής:

- Βασική στιβάδα (stratum germinativum)
- Ακανθωτή στιβάδα (stratum spinosum)
- Κοκκιώδης στιβάδα (stratum granulosum)
- Κεράτινη στιβάδα (stratum corneum)

Στα πέλματα και στις παλάμες, μεταξύ της κεράτινης και της κοκκιώδους στιβάδας, υπάρχει και η διαυγής στιβάδα (stratum lucidum).<sup>6</sup>



Εικόνα 2<sup>5</sup>: Στιβάδες επιδερμίδας.

### 1.1.1.1 Βασική στιβάδα

Η βασική στιβάδα, η βαθύτερη στιβάδα της επιδερμίδας, αποτελείται από μια σειρά επιθηλιακών κυττάρων κυλινδρικού σχήματος, τα οποία διατάσσονται το ένα δίπλα στο άλλο. Στην πραγματικότητα, όλα τα συστατικά της κεράτινης στιβάδας προέρχονται από την βασική στιβάδα της επιδερμίδας. Τα κερατινοκύτταρα, λοιπόν, ξεκινάνε από τη βασική στιβάδα, στην οποία υφίστανται μιτώσεις, οδηγούνται σταδιακά από την ακανθώδη στην κοκκιώδη, καταλήγοντας στην κεράτινη στιβάδα απ'όπου πέφτουν σαν κεράτινα πετάλια. Διαθέτουν ένα μεγάλο βαθυχρωματικό πυρήνα με έναν ή περισσότερους πυρηνίσκους ενώ το κυτταρόπλασμα τους περιέχει ριβοσώματα, μιτοχόνδρια και τονοϊνίδια τα οποία συνδέουν τα κύτταρα της επιδερμίδας μεταξύ τους. Τα κερατινοκύτταρα, συνδέονται μεταξύ τους μέσω των τονοϊνιδίων, σχηματίζοντας τα δεσμοσώματα.<sup>8,9</sup> Εντός της βασικής στιβάδας, υπάρχουν επίσης τα μελανοκύτταρα ή δενδριτικά κύτταρα τα οποία παράγουν τη χρωστική ουσία που μας προστατεύει από τις υπεριώδεις ακτίνες του ηλίου, τη μελανίνη. Για κάθε μελανοκύτταρο αντιστοιχούν πέντε επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στιβάδας. Τα μελανοκύτταρα διαθέτουν απολήξεις, τους δενδρίτες, με τους οποίους διακλαδίζονται γύρω από τα κερατινοκύτταρα και, ως εκ τούτου, μεταναστεύουν μαζί τους στην κεράτινη στιβάδα. Οι δενδρίτες περιέχουν μελανοσώματα. Τα μελανοσώματα διαθέτουν κοκκία μελανίνης τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της μελανίνης. Τέλος, στη βασική στιβάδα εμπεριέχονται και τα κύτταρα Merkel μέσω των οποίων γίνονται αντιληπτά τα ερεθίσματα του δέρματος καθώς συνδέονται με τις νευρικές απολήξεις.<sup>10</sup>

### **1.1.1.2 Ακανθωτή στιβάδα**

Η ακανθωτή στιβάδα βρίσκεται πάνω από τη βασική στιβάδα και αποτελείται από 2-8 σειρές κερατινοκυττάρων. Το όνομα της οφείλεται στις άκανθες που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων της. Τα κύτταρα συνδέονται μεταξύ τους με μεσοκυττάρια γέφυρες, τα δεσμοσωμάτια.<sup>11</sup> Μεταξύ των κυττάρων της ακανθωτής στιβάδας, υπάρχουν και τα κύτταρα του Langerhans τα οποία είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού. Τα κύτταρα του Langerhans διαθέτουν επίσης απολήξεις με τις οποίες διακλαδίζονται στα επιθηλιακά κύτταρα. Ο ρόλος τους είναι να δεσμεύουν αντιγόνα και να συμμετέχουν ενεργά στην ανοσολογική λειτουργία.<sup>12</sup>

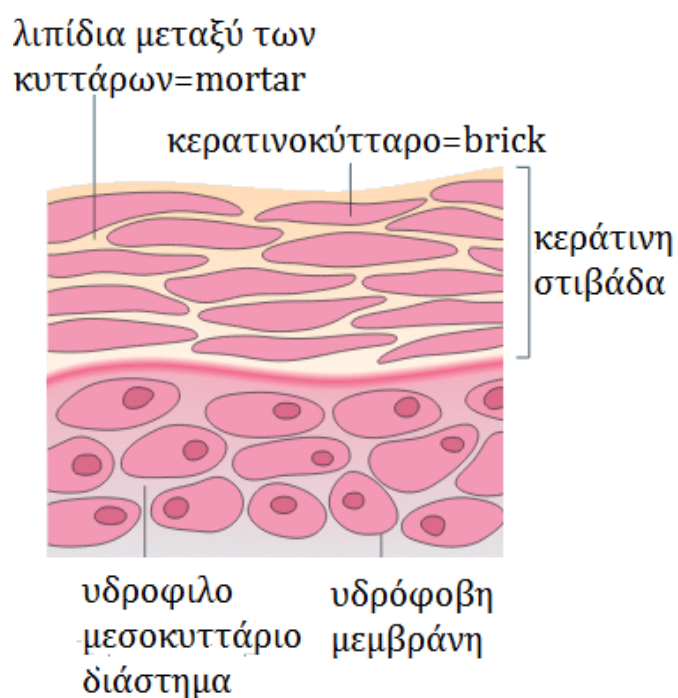
### **1.1.1.3 Κοκκιώδης στιβάδα**

Στην κοκκιώδη στιβάδα ξεκινά η κερατινοποίηση των κερατινοκυττάρων. Αποτελείται από 2-3 σειρές ατρακτοειδών αποπεπλατυσμένων κερατινοκυττάρων τα οποία περιέχουν κοκκία κερατοϋαλίνης (πρόδρομη ουσία της κερατίνης). Επιπλέον, στην κοκκιώδη στιβάδα εμπεριέχονται τα σωμάτια του Odland. Τα σωμάτια του Odland ή αλλιώς κερατινοσώματα περιέχουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων όπως κεραμίδια, χοληστερόλη, εστέρες χοληστερόλης, ελεύθερα λιπαρά οξέα και τριγλυκερίδια τα οποία αποβάλλονται στο μεσοκυττάριο χώρο, συμβάλλοντας, έτσι, στη λειτουργία του φραγμού της κεράτινης στιβάδας.<sup>10,11,13</sup>

### **1.1.1.4 Κεράτινη στιβάδα**

Η κεράτινη στιβάδα αποτελείται από νεκρά, κερατινοποιημένα, απύρρινα, σχεδόν αδιαπέραστα κύτταρα, τα λεγόμενα κερατινοκύτταρα που το κυτταρόπλασμά τους έχει αντικατασταθεί από πρωτεΐνες όπως η κερατίνη, η φιλαγκρίνη και η ινβολουκρίνη.<sup>6,14</sup> Τα κερατινοκύτταρα είναι ενσωματωμένα σε μία συνεχή λιπιδική μήτρα διαφόρων λιπιδίων. Δομικά, αυτό το επιδερμικό στρώμα παρομοιάζεται συχνά με ένα τοίχο από τούβλα (τα κερατινοκύτταρα) και κονίαμα (τα μεσοκυττάρια λιπίδια) και είναι γνωστό ως brick and mortar model (Εικόνα 3).<sup>10</sup> Κατά τη διάρκεια 28 ημερών, τα κύτταρα που προέρχονται από τη βασική στιβάδα μεταναστεύουν στην επιφάνεια του δέρματος, υποβάλλονται σε διάφορες καταστάσεις διαφοροποίησης και συμμετέχουν στη διαδικασία της κερατινοποίησης. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα χάνουν τους πυρήνες τους, γίνονται επίπεδα, απορρίπτουν λιπίδια στο μεσοκυττάριο χώρο (κοκκιώδης στιβάδα), και κερατινοποιούνται, δημιουργώντας, έτσι, τη μοναδική

δομή της κεράτινης στιβάδας.<sup>6</sup> Τα κύτταρα πεθαίνουν όταν φτάσουν στο ανώτερο επίπεδο της επιδερμίδας (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος).<sup>10</sup> Επιπλέον, τα κύτταρα είναι πιο σφιχτά στο εσωτερικό της στιβάδας, ενώ όσο ανεβαίνουν προς την επιφάνεια χαλαρώνουν μέχρι να απομακρυνθούν πλήρως. Το πάχος της είναι συνήθως 10-25  $\mu\text{m}$ , με εξαιρέσεις στα πέλματα των ποδιών και τις παλάμες.<sup>6</sup> Η κεράτινη στιβάδα είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία του φραγμού του δέρματος, καθώς ελέγχει τη διαδερμική απορρόφηση ουσιών από το εξωτερικό περιβάλλον και προστατεύει από την άδηλη απώλεια των υγρών του δέρματος.<sup>13</sup>



Εικόνα 3<sup>15</sup>: Brick and mortar model.

### 1.1.2 Κυρίως δέρμα ή χόριο<sup>16,17</sup>

Το χόριο είναι ανθεκτικός και ελαστικός ιστός, πάχους 3 έως 5 mm, που στηρίζει την επιδερμίδα και τη συνδέει με τον υποδόριο ιστό. Μεταξύ επιδερμίδας και κυρίου δέρματος υπάρχει ο δερμοεπιδερμικός σύνδεσμος. Ο δερμοεπιδερμικός σύνδεσμος έχει διττό ρόλο, τη μηχανική στήριξη της επιδερμίδας και την επικοινωνία με αυτήν, δηλαδή την ανταλλαγή ουσιών. Το κυρίως δέρμα χωρίζεται σε δύο στρώματα, το θηλώδες στρώμα, που βρίσκεται κοντά στο δερμοεπιδερμικό σύνδεσμο, και το δικτυωτό στρώμα, μεταξύ θηλώδους και υποδορίου ιστού. Αποτελείται από τη μεσοκυττάρια ουσία και τα κύτταρα του συνδετικού του ιστού. Η μεσοκυττάρια ουσία, ή αλλιώς μήτρα συνδετικού ιστού, απαρτίζεται από ίνες κολλαγόνου και

ελαστίνης. Οι ίνες αυτές περιβάλλονται από μία άμορφη γέλη, τη λεγόμενη θεμέλια ουσία που περιέχει γλυκοζαμινογλυκάνες. Όσον αφορά τα κύτταρα του χορίου, οι ινοβλάστες (παράγουν της ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης), τα πλασματοκύτταρα, τα φαγοκύτταρα και τα ιστιοκύτταρα, αποτελούν τον κύριο κυτταρικό πληθυσμό. Επιπλέον, στο χόριο, εντοπίζονται τα εξαρτήματα του δέρματος, τα νεύρα και τα αιμοφόρα αγγεία, τα οποία προέρχονται από τα μεγαλύτερα αγγεία του υποδορίου ιστού και παρέχουν θρεπτικές ουσίες στη ζώσα επιδερμίδα.

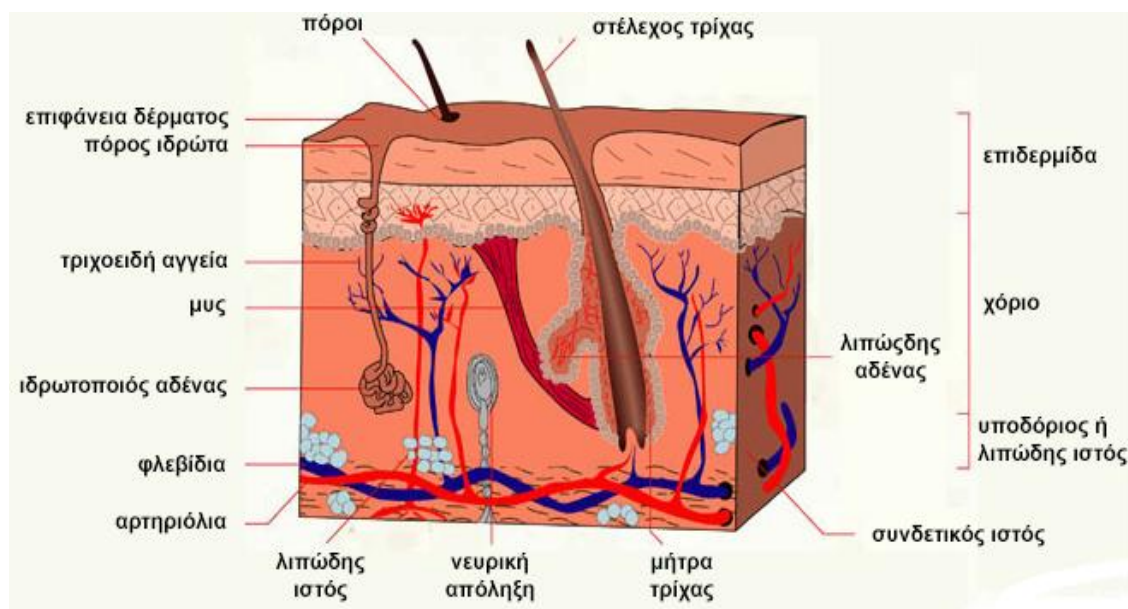
### 1.1.3 Υποδόριος ιστός<sup>18</sup>

Ο υποδόριος ιστός, ή αλλιώς υπόδερμα, είναι το κατώτερο στρώμα του δέρματος και απαρτίζεται από λιποκύτταρα, εξαρτήματα του δέρματος, αιμοφόρα αγγεία και νεύρα. Ο υποδόριος ιστός συμβάλλει στην απορρόφηση των δονήσεων, στην αποθήκευση θρεπτικών ουσιών και στη θερμική μόνωση.

## 1.2 Εξαρτήματα δέρματος

Τα εξαρτήματα του δέρματος (Εικόνα 4) διακρίνονται σε:

- Τρίχες
- Ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες
- Νύχια



Εικόνα 4<sup>19</sup>: Εγκάρσια διατομή δέρματος.



Η τριχοσημηγματογόνος συσκευή αποτελείται από το τριχοθυλάκιο, το στέλεχος της τρίχας, τους σημηγματογόνους αδένες και τον ορθωτήρα μυ της τρίχας. Τα τριχικά θυλάκια βρίσκονται σε όλη την επιφάνεια του δέρματος με εξαίρεση τα χείλη, τις παλάμες, και τα πέλματα. Στο κατώτερο άκρο του τριχοθηλακίου σχηματίζεται ο βολβός της τρίχας, ο οποίος συνδέεται με απολήξεις νεύρων και με αιμοφόρα αγγεία. Τα αιμοφόρα αγγεία συντελούν στον πολλαπλασιασμό των βλαστοκυττάρων που βρίσκονται στο βολβό της τρίχας και, τελικά, στην παραγωγή του στελέχους της. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι παρόμοιος με αυτόν των επιδερμικών κυττάρων, αλλά ταχύτερος. Στη συνέχεια, τα κύτταρα διαφοροποιούνται και σχηματίζουν το στέλεχος της τρίχας, το οποίο είναι κατασκευασμένο από σκληρή κερατίνη.<sup>20</sup> Στο βολβό, επίσης, υπάρχουν και μελανοκύτταρα τα οποία ευθύνονται για το χρώμα των μαλλιών μας. Τέλος, ο ορθωτήρας μυς είναι υπεύθυνος για το αίσθημα ανατριχίλας που νιώθουμε καθότι όταν συσπάται, εκτείνεται η τρίχα.<sup>10</sup>

Οι σημηγματογόνοι αδένες παράγουν το σμήγμα, ένα μίγμα από σκουαλένιο, εστέρες κηρών, τριγλυκερίδια, χοληστερόλη, και ελεύθερα λιπαρά οξέα, το οποίο εκκρίνουν στο τριχοθυλάκιο. Το σμήγμα, τελικά, φθάνει στην επιφάνεια του δέρματος και δημιουργείται ένα λιπιδικό υμένιο το οποίο λιπαίνει και προστατεύει το δέρμα ενώ παράλληλα βοηθά στη ρύθμιση του pH του δέρματος.<sup>6</sup>

Οι ιδρωτοποιοί αδένες βρίσκονται σε όλη την επιφάνεια τα δέρματος και εκκρίνουν ένα ελαφρώς όξινο ή ουδέτερο διάλυμα ιονικής φύσεως.<sup>6,10</sup>

### **1.3 Λειτουργία δέρματος<sup>9,10,21,22</sup>**

Το δέρμα αποτελεί πολύτιμο όργανο το οποίο επιτελεί πολλές και σημαντικές λειτουργίες, όπως:

- ✓ Προασπιστική λειτουργία

Το δέρμα, χάρη στη φυσιολογία του, μας προστατεύει έναντι μηχανικών και ηλεκτρικών κακώσεων, θερμικών επιδράσεων, μικροβιακών προσβολών ενώ παράλληλα εμποδίζει την άδηλη απώλεια νερού. Επιπλέον, η παραγωγή μελανίνης στα κύτταρα της επιδερμίδας, μας προφυλάσσει από τις υπεριώδεις ακτίνες του ήλιου.

✓ Αισθητήρια λειτουργία

Το δέρμα θεωρείται υποδεκτικό όργανο, αφού βρίσκεται σε συνεχή επικοινωνία με το περιβάλλον και μεταβιβάζει ερεθίσματα από και προς αυτό.

✓ Απεκκριτική λειτουργία

Η παραγωγή και η αποβολή ουσιών, όπως το σμήγμα και ο ιδρώτας, συμβάλλουν στην προστασία του δέρματος.

✓ Ανοσοποιητική λειτουργία

Η επιδερμίδα θεωρείται ως η πρώτη ανοσοποιητική άμυνα του οργανισμού. Τα πλασματοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα που βρίσκονται σε αυτήν, συμβάλλουν στη λειτουργία της χημικής ανοσίας, παράγοντας αντισώματα.

✓ Μεταβολική λειτουργία

Το δέρμα είναι μεταβολικό όργανο του νερού, του λίπους, των βιταμινών, των ηλεκτρολυτών και των πρωτεϊνών.

✓ Θερμορυθμιστική λειτουργία

Η παραγωγή του ιδρώτα από τους ιδρωτοποιούς αδένες και η διέγερση των αιμοφόρων αγγείων, ρυθμίζουν τη θερμοκρασία του σώματος και τη διατηρούν σε σταθερά επίπεδα.

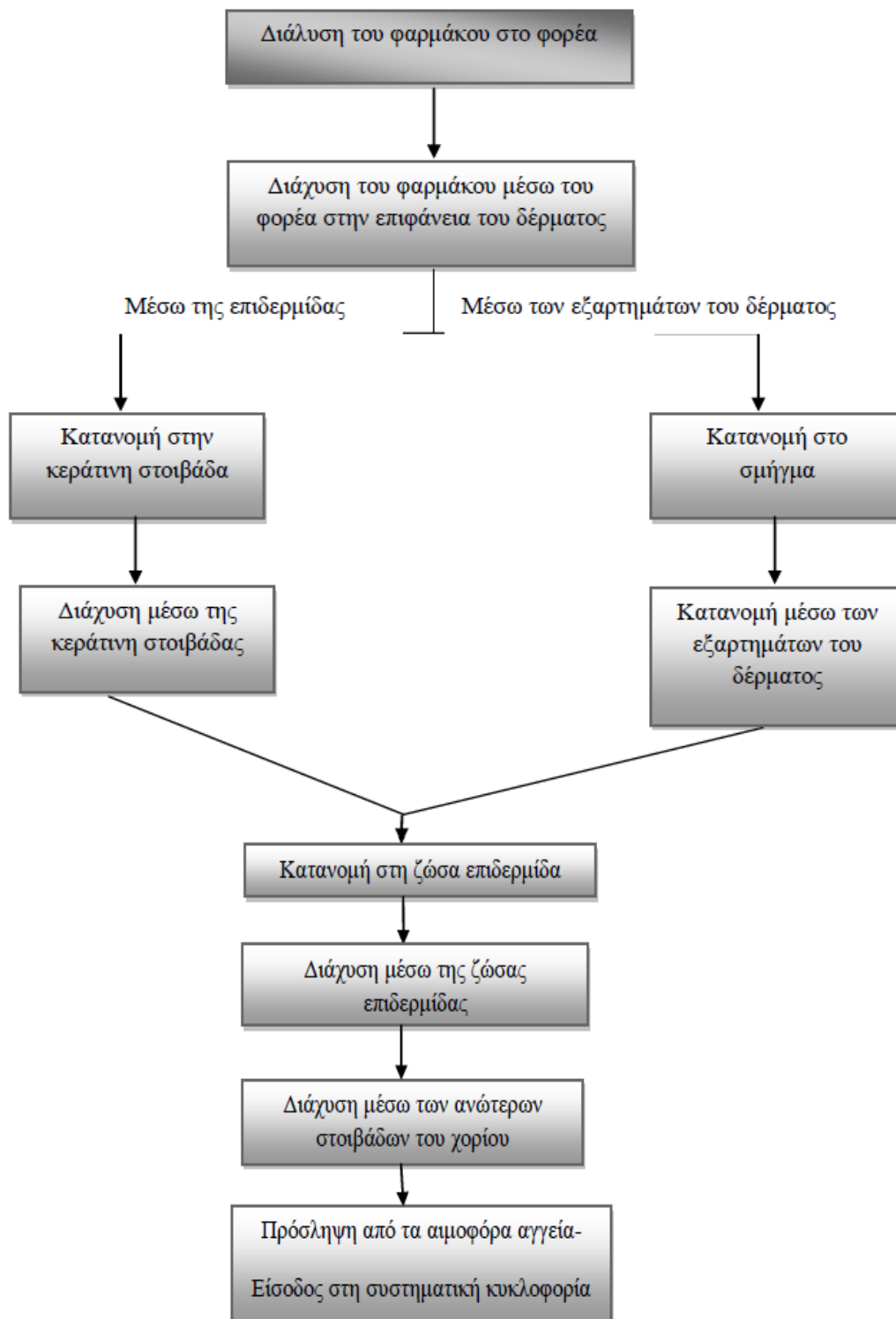
✓ Κερατινοποίηση

Η επιδερμίδα είναι ο φραγμός του δέρματος. Η διαφοροποίηση των κυττάρων από τη βασική προς την κεράτινη στιβάδα, έχει ως τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή κερατίνης και λίπους που την καθιστούν στερεή και ελαστική.

#### **1.4 Διαδερμική διαπερατότητα**

Η κεράτινη στιβάδα ενεργεί ως φραγμός διαπέρασης ενδογενών και εξωγενών ουσιών και, ως εκ τούτου, αποτελεί το καθοριστικό βήμα της κινητικής της διαδερμικής απορρόφησης μορίων.<sup>23</sup> Η διαδερμική οδός διαπέρασης περιλαμβάνει αρκετά στάδια (Σχήμα 1).

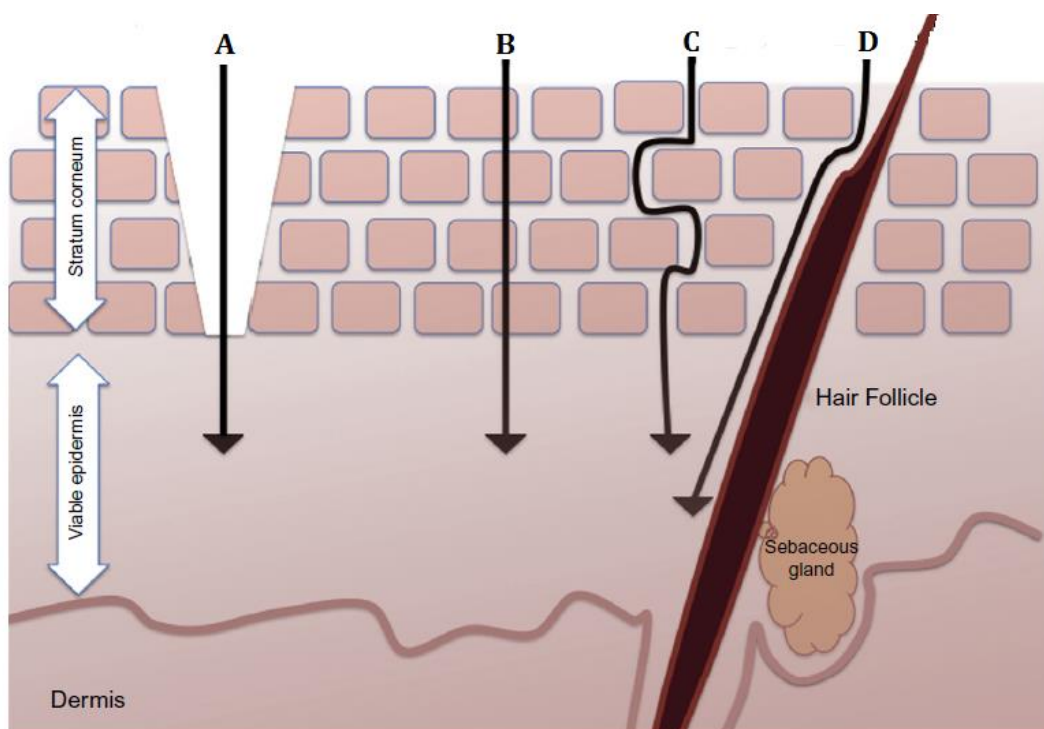
Ουσιαστικά, το μόριο διαχέεται διαμέσου της κεράτινης στοιβάδας και της ζώσας επιδερμίδας και τελικά καταλήγει στην κυκλοφορία μέσω των ανώτερων στοιβάδων του χορίου.<sup>24</sup>



Σχήμα 1<sup>24</sup>: Στάδια διαδερμικής απορρόφησης.

Η διαπερατότητα του δέρματος (Εικόνα 5), και των υπολοίπων βιολογικών μεμβρανών, για την πλειονότητα των φαρμακομορίων, θεωρείται ότι επιτυγχάνεται με το μηχανισμό της παθητικής διάχυσης, μέσω<sup>25</sup>:

1. Διακυττάριας ή ενδοκυττάριας οδού (intracellular or transcellular pathway)
2. Παρακυττάριας ή εξωκυττάριας οδού (intercellular or paracellular or extracellular pathway)
3. Εξαρτημάτων του δέρματος
4. Μηχανικών μεθόδων απομάκρυνσης της κεράτινης στιβάδας και αύξησης της διαδερμικής απορρόφησης.



Εικόνα 5<sup>26</sup>: Σχηματική αναπαράσταση των οδών διείσδυσης ουσιών στο δέρμα.

A) Διείσδυση μορίων στο δέρμα με τη συνεργία μηχανικών μεθόδων που απομακρύνουν μερικώς την κεράτινη στιβάδα. B) Ενδοκυττάρια οδός διαπέρασης ουσιών μέσω των κερατινοκυττάρων. C) Παρακυττάρια μεταφορά ουσιών μέσω των λιπιδίων της κεράτινης στιβάδας. D) Διαπέραση μορίων διαμέσου των εξαρτημάτων του δέρματος.

Η διείσδυση των ουσιών διαμέσου των κερατινοκυττάρων και των λιπιδικών περιοχών που παρεμβάλλονται, η λεγόμενη ενδοκυττάρια οδός, περιλαμβάνει μεσολάβηση φορέα της ουσίας και μηχανισμούς μεταφοράς.<sup>27</sup> Λόγω της χαμηλής διαπερατότητας των μορίων μέσα από τα κερατινοκύτταρα, χρησιμοποιούνται ενισχυτές διαπέρασης για την ενδοκυττάρια διαδρομή.<sup>6</sup> Η παρακυττάρια οδός

θεωρείται ότι είναι η κύρια διαδρομή διείσδυσης ουσιών στο δέρμα και πραγματοποιείται διαμέσου των λιπιδικών στοιβάδων που βρίσκονται μεταξύ των κερατινοκυττάρων, επιτρέποντας τη διαπέραση υδρόφιλων ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους, ιόντων και λιπόφιλων μορίων.<sup>27</sup> Η παρακυττάρια διαδρομή αποδίδει πολύ ταχύτερη απορρόφηση λόγω του υψηλού συντελεστή διάχυσης των περισσότερων φαρμάκων.<sup>6</sup> Ο φυσικός φραγμός της διακυττάριας οδού είναι η λιπιδική μήτρα των μεμβρανών ενώ της παρακυττάριας οδού είναι οι ενδοκυτταρικές συνδέσεις.<sup>27</sup>

Επιπλέον, στην απορρόφηση ουσιών από το δέρμα, συμβάλλουν, σε μικρότερο βαθμό, τα εξαρτήματα του δέρματος όπως τα τριχοθηλάκια με τους σμηγματογόνους αδένες και οι ιδρωτοποιοί αδένες.<sup>28</sup>

Τέλος, επειδή το δέρμα αποτελεί φραγμό στην απορρόφηση των περισσότερων φαρμάκων, χρησιμοποιείται ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών μηχανισμών για την ενίσχυση της διαδερμικής διείσδυσης, όπως χρήση επιταχυντών διαβατότητας, ιοντοφόρησης, μικροβελονών, υπέρηχοι, ηλεκτροδιάτρηση, μαγνητοφόρηση.<sup>29</sup>

### **1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση**

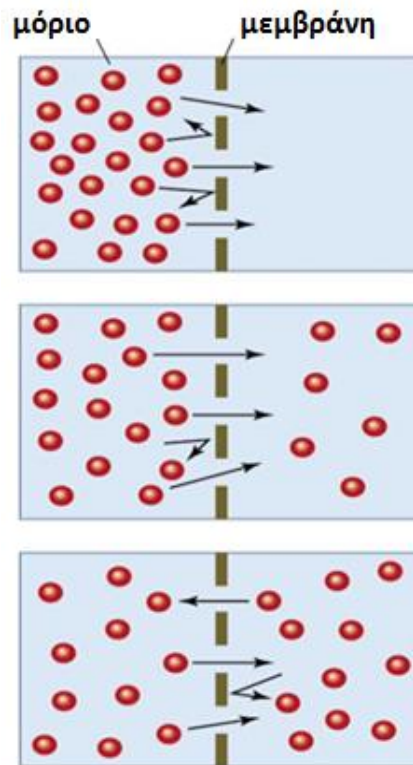
Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδερμική απορρόφηση των φαρμακομορίων, διακρίνονται σε:

- Βιολογικούς παράγοντες<sup>30,31</sup> όπως:
  - i. Κατάσταση του δέρματος
  - ii. Ηλικία του δέρματος
  - iii. Ανατομική περιοχή του δέρματος
  - iv. Δέρμα από διάφορα είδη
  - v. Μεταβολισμός από το δέρμα
  - vi. Ροή του αίματος
- Φυσικοχημικούς παράγοντες,<sup>32,33</sup> όπως:
  - i. Ενυδάτωση του δέρματος
  - ii. Θερμοκρασία
  - iii. Συγκέντρωση του φαρμάκου
  - iv. Φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου
  - v. Αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-δέρματος
  - vi. Φορέας του φαρμάκου

## 1.6 Κινητική της διαδερμικής απορρόφησης

### 1.6.1 Θεωρία της διάχυσης

Κάθε πέρασμα εντός και μέσω του δέρματος διέπεται από διαδικασίες διάχυσης, και πιο συγκεκριμένα, παθητικής διάχυσης.<sup>34</sup> Παθητική διάχυση είναι η διαδικασία μεταφοράς μάζας από μία περιοχή ενός συστήματος σε μία άλλη εξαιτίας αυθόρμητης μοριακής κίνησης (Εικόνα 6).<sup>35</sup>



Εικόνα 6<sup>36</sup> : Παθητική μεταφορά μάζας.

### 1.6.2 Νόμοι διάχυσης

Η διάχυση αφορτιστων ενώσεων κατά μήκος μιας μεμβράνης ή οποιουδήποτε ομοιογενή φραγμού, με απλή μοριακή διαπέραση ή με κίνηση μέσω πόρων ή διαύλων, περιγράφεται από τον πρώτο και δεύτερο νόμο του Adolf Fick.<sup>34</sup>

#### Πρώτος νόμος του Fick

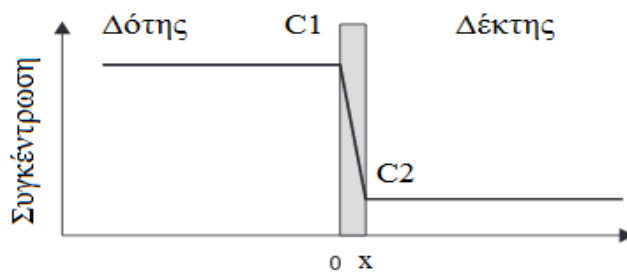
Η σταθερή κατάσταση διάχυσης μπορεί να περιγραφεί χρησιμοποιώντας τον πρώτο νόμο του Fick.<sup>37</sup>

Ο πρώτος νόμος του Fick δηλώνει ότι η ροή είναι ανάλογη με το βαθμό της συγκέντρωσης των μορίων της ουσίας που περνούν διαμέσου του φραγμού:

$$J = -D \cdot \frac{dC}{dx}$$

εξίσωση 1

όπου  $D$  είναι ο συντελεστής διάχυσης του παράγοντα διείσδυσης ( $\text{cm}^2/\text{sec}$ ),  $C$  η συγκέντρωση των μορίων της ουσίας ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ),  $x$  η απόσταση που διανύει η ουσία κάθετα προς την επιφάνεια του φραγμού ( $\text{cm}$ ) και  $J$  η ροή ( $\text{g}/\text{cm}^2\text{sec}$ ). Ο παράγοντας  $dC/dx$  εκφράζει την ανομοιομορφία της κατανομής στο συγκεκριμένο σημείο. Το αρνητικό πρόσημο στην εξίσωση 1 τίθεται για να δηλώσει τη φορά της διάχυσης από θέσεις μεγαλύτερης συγκέντρωσης του διαχεόμενου στοιχείου προς θέσεις μικρότερης συγκέντρωσης και, έτσι, η ροή είναι πάντα μια θετική ποσότητα (Σχήμα 2).

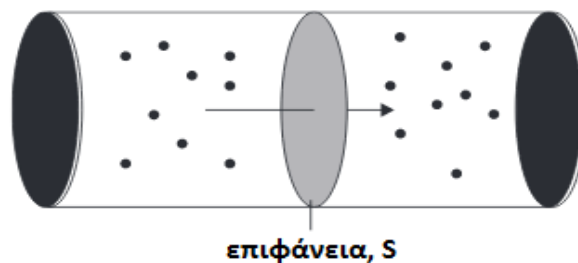


Σχήμα 2<sup>38</sup>: Απεικόνιση της παθητικής διάχυσης ( $C1 > C2$ ).

Η ροή (Εικόνα 7) είναι η ποσότητα της ύλης,  $M$ , που διαχέεται ανά μονάδα επιφάνειας φράγματος,  $S$ , στη μονάδα του χρόνου,  $t$ , και συμβολίζεται:

$$J = \frac{dM}{sdt}$$

εξίσωση 2



Εικόνα 7<sup>38</sup>: Απεικόνιση της ροής, δηλαδή της κίνησης των μορίων μέσω της εγκάρσιας διατομής της μεμβράνης σε μία δεδομένη χρονική στιγμή.

Η κίνηση της μάζας θα σταματήσει όταν εξισορροπηθεί η συγκέντρωση του παράγοντα διείσδυσης ανάμεσα στις δύο θέσεις, δηλαδή όταν ο όρος  $dC/dx$  πλησιάσει το μηδέν. Η κατάσταση κατά την οποία η συγκέντρωση του διαχεόμενου μορίου δε μεταβάλλεται με το χρόνο, ονομάζεται σταθερή κατάσταση (steady state).

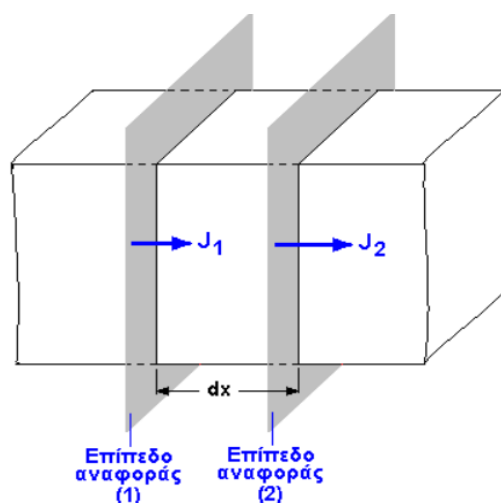
### Δεύτερος νόμος του Fick

Ο δεύτερος νόμος του Fick δίνει την εξίσωση που αναδεικνύει πώς μεταβάλλεται η συγκέντρωση του διαχεόμενου στοιχείου σε οποιοδήποτε σημείο, και όχι σε μια μονάδα επιφάνειας του φράγματος, στη μονάδα του χρόνου.<sup>39</sup>

$$-\frac{\partial J}{\partial x} = \frac{\partial C}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}$$

εξίσωση 3

Κάθε σημείο του χώρου μπορεί να έχει μια διαφορετική ροή (Εικόνα 8). Ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης είναι ανάλογος της διαφοράς της ροής από το ένα μέρος του χώρου στο άλλο.<sup>40</sup>



Εικόνα 8<sup>39</sup>: Η ροή διαφέρει από το ένα σημείο του χώρου στο άλλο (2<sup>ος</sup> νόμος Fick).

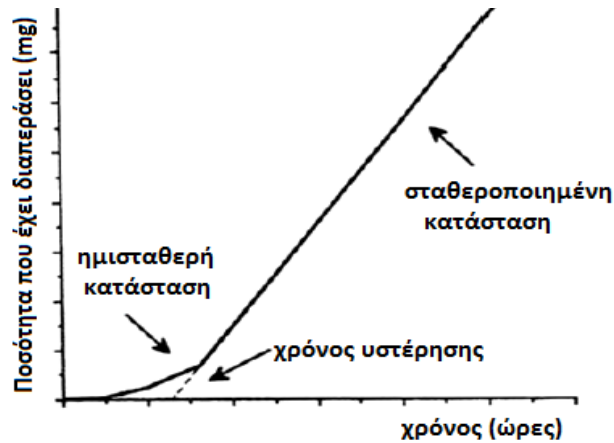
Η συγκέντρωση της ουσίας μειώνεται με το χρόνο καθώς αυτή διαχέεται στη μεμβράνη, και ταυτόχρονα αυξάνεται καθώς εισέρχεται σε αυτή έως ότου επιτευχθεί ισορροπία, δηλαδή όταν ο όρος  $dC/dt$  γίνει μηδέν. Η συγκέντρωση, όμως, δε σταθεροποιείται άμεσα, αλλά διαφέρει ελαφρώς με το χρόνο και η κατάσταση αυτή αναφέρεται ως ημισταθερή κατάσταση (quasistationary state).<sup>41</sup> Ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη ομοιόμορφης συγκέντρωσης της ουσίας μέσα στη μεμβράνη είναι γνωστός ως χρόνος υστέρησης,  $t_L$  (Σχήμα 3).



Ο χρόνος υστέρησης δίνεται από την εξίσωση 5

$$t_L = \frac{h^2}{6 \times D}$$

όπου  $h$  είναι το πάχος της μεμβράνης.



Σχήμα 3<sup>41</sup>: Απαιτούμενη χρονική πορεία για την επίτευξη σταθεροποιημένης κατάστασης (χρόνος υστέρησης,  $t_L$ ).

### 1.6.3 Παράγοντες που καθορίζουν τη διαδερμική διάχυση

Γενικά, η διάχυση του φαρμάκου στην κεράτινη στοιβάδα καθορίζεται κατά μεγάλο βαθμό από την κεράτινη στοιβάδα και από αλληλοεξαρτώμενες φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου (Σχήμα 4).<sup>42</sup> Μερικές από αυτές είναι η διαλυτότητα, το σημείο τήξης, η λιποφιλία, το φορτίο, ο βαθμός ιονισμού, η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, η αμφιφιλία, η κατανομή φορτίου, το μέγεθος, το σχήμα των μορίων και το εμβαδόν της πολικής μοριακής επιφάνειάς του φαρμακομορίου.



Σχήμα 4<sup>42</sup>: Πλέγμα φυσικοχημικών ιδιοτήτων που καθορίζουν το βαθμό διάχυσης του φαρμακομορίου.

Πιο συγκεκριμένα, η διαπέραση ενός φαρμάκου μέσω του άθικτου δέρματος απαιτεί φάρμακα στην αδιάστατη μορφή τους, με μοριακό βάρος μικρότερο από 500 Da (ο κανόνας των 500 Da), μέτριο βαθμό λιποφιλίας (Log P μεταξύ 1–3) και υψηλό σημείο τήξης (μικρότερο των 200°C).<sup>43,44</sup>

### **1.7 Τοπικές φαρμακοτεχνικές μορφές**

Οι φαρμακοτεχνικές μορφές (Φ/Μ) που εφαρμόζονται στο δέρμα ασκούν τοπική δράση ή προκαλούν διαδερμική διείσδυση των δραστικών ουσιών.<sup>31</sup> Οι μέθοδοι χορήγησης φαρμάκου στο δέρμα μπορούν να διακριθούν ανάλογα με την κατανομή της δραστικής ουσίας σε συγκεκριμένες περιοχές του οργανισμού, όπως<sup>45,46</sup>:

- Τοπική χορήγηση

Το φάρμακο εφαρμόζεται στην επιδερμίδα και η ουσία δρα τοπικά στην κεράτινη στιβάδα, χωρίς να τη διαπερνά, για την αντιμετώπιση δερματικών παθήσεων ή τη φροντίδα του δέρματος.

- Διαδερμική χορήγηση

Η φαρμακοτεχνική μορφή εφαρμόζεται τοπικά στην κεράτινη στιβάδα, διαχέεται στη ζώσα επιδερμίδα και φτάνει ως τους υποδόριους ιστούς. Μικρές ποσότητες φαρμάκου είναι δυνατόν να εισέλθουν στα τριχοειδή αγγεία, χωρίς όμως να προκληθεί κάποια φαρμακολογική δράση, καθότι η συγκέντρωση του στη γενική κυκλοφορία είναι ελάχιστη.

- Ελεγχόμενη διαδερμική χορήγηση (Transdermal Therapeutics Systems – TTS)

Η ποσότητα της δραστικής ουσίας που διαπερνά την κερατίνη στιβάδα και εισέρχεται στα αγγεία της επιδερμίδας και από εκεί στη γενική κυκλοφορία είναι αρκετή για την επίτευξη συστηματικής θεραπείας (κατανομή του φαρμάκου στον οργανισμό).

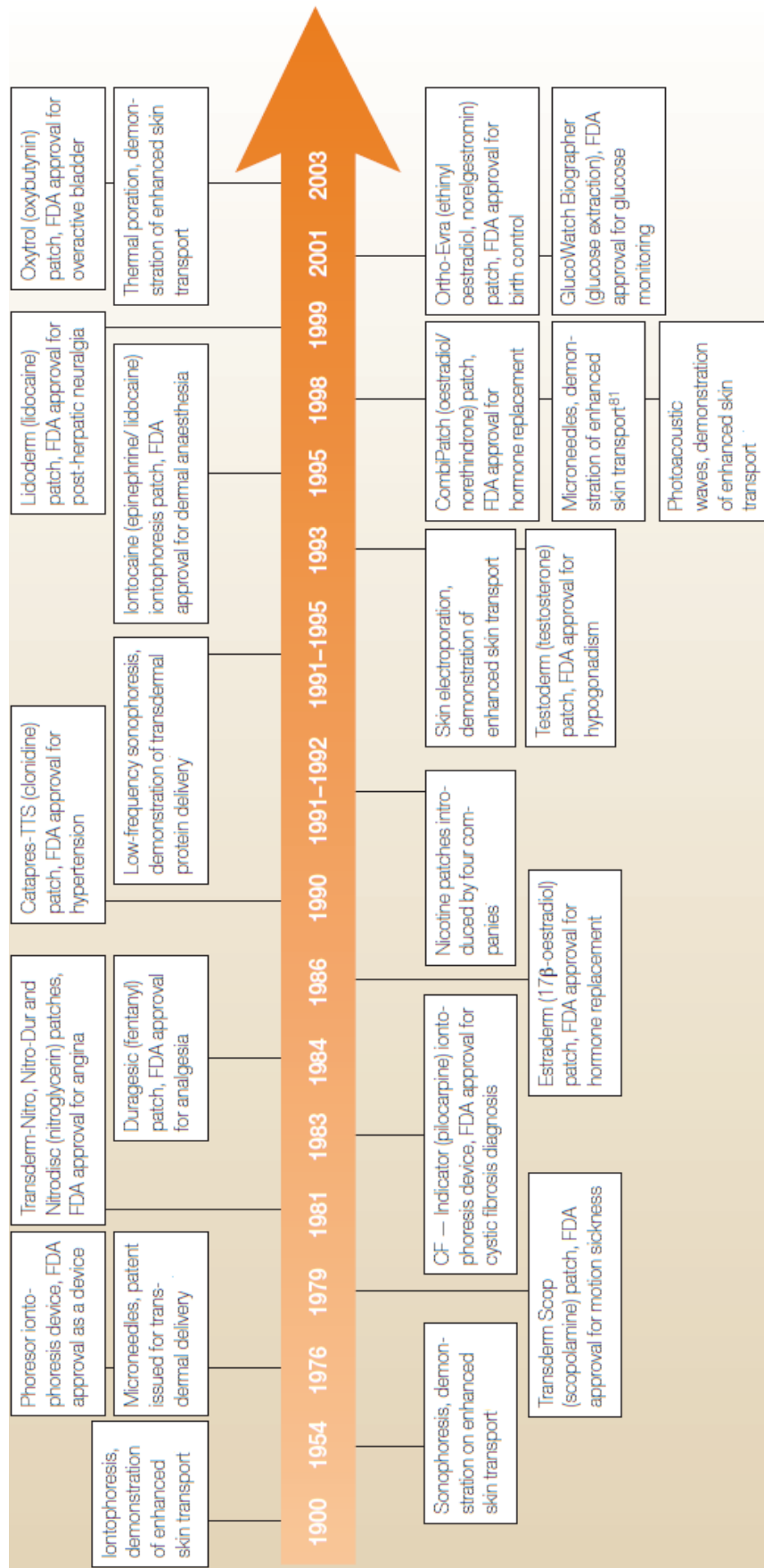
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ

#### 2.1 Εισαγωγή

Τα φαρμακευτικά προϊόντα που εφαρμόζονται στο δέρμα για συστηματική δράση αναφέρονται ως διαδερμικά συστήματα (TDDS) ή έμπλαστρα (patches). Τα διαδερμικά θεραπευτικά συστήματα (TDDS) είναι διακριτές δοσολογικές μορφές ενός ή περισσοτέρων δραστικών συστατικών, τα οποία εφαρμόζονται σε ακέραιο δέρμα, με σκοπό τη συστηματική δράση του φαρμάκου, αφού αυτό περάσει το προστατευτικό φραγμό του δέρματος.<sup>47</sup>

Η αξιολόγηση του δέρματος ως πιθανή οδός χορήγησης φαρμακευτικών μορίων για συστηματική δράση άρχισε πολλά χρόνια πριν (Εικόνα 9). Το κύριο θέμα στις πρώτες μελέτες διαδερμικής χορήγησης ήταν ο λόγος για τον οποίο το δέρμα έχει ιδιότητες φραγμού και τη σχέση του με τη μοριακή διαπερατότητα. Το 1924, ανακαλύφθηκε ότι το στρώμα κυττάρων που ενώνει το λεπτό, εξωτερικό στρώμα του δέρματος με την επιδερμίδα, η κεράτινη στιβάδα, θέτει τη μεγαλύτερη αντίσταση στη διαδερμική διαπερατότητα.<sup>48</sup> Στη συνέχεια, η υπόθεση αυτή τροποποιήθηκε, όταν αφαιρέθηκαν διαδοχικά στρώματα της κεράτινης στιβάδας από την επιφάνεια του δέρματος με ταυτόχρονη αύξηση της απώλειας νερού του δέρματος.<sup>49</sup> Έπειτα, έγινε γνωστό ότι η διαδερμική διαπερατότητα της κεράτινης στιβάδας περιοριζόταν από μία παθητική διαδικασία.<sup>50,51</sup> Παρά τις σημαντικές ιδιότητες φραγμού του δέρματος, ορισμένα φάρμακα είχαν σημαντική διαπερατότητα, η οποία και τεκμηριώθηκε από τη μέτρηση των αντίστοιχων συντελεστών διάχυσης στην κεράτινη στιβάδα.<sup>52</sup> Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι ουσίες με μοριακό βάρος κάτω των 600 daltons και με κατάλληλες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η λιποφιλία, μπορούσαν να διαπεράσουν το φυσιολογικό δέρμα.<sup>53</sup> Χάρη σε αυτά τα ευρήματα, τα διαδερμικά έμπλαστρα αναπτύχθηκαν ενεργά τη δεκαετία του 1970, με το πρώτο έμπλαστρο να παίρνει έγκριση από τον FDA των ΗΠΑ το 1979. Μέχρι σήμερα, ο FDA έχει εγκρίνει, περίπου 115 διαδερμικά προϊόντα που καλύπτουν 15 διαφορετικά μόρια όπως η κλονιδίνη, φεντανύλη, νικοτίνη, νιτρογλυκερίνη, οιστραδιόλη, οξυβουτινίνη, τεστοστερόνη, λιδοκαΐνη, πριλοκαΐνη, σκοπολαμίνη και το οξικό άλας νορεθιδρόνης.<sup>54</sup> Η ετήσια αγορά διαδερμικών εμπλάστρων στις ΗΠΑ ξεπερνά τα 3 δις δολάρια.



Εικόνα 9<sup>29</sup>: Σημαντικά γεγονότα στη διαδερμική χορήγηση φαρμάκου.

## 2.2 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα διαδερμικής χορήγησης

Η χορήγηση φαρμάκων μέσω του δέρματος χρησιμοποιώντας ένα διαδερμικό σύστημα χορήγησης (transdermal drug delivery systems – TDDS), προσφέρει έναν αριθμό πλεονεκτημάτων, σε σύγκριση με τις συμβατικές οδούς χορήγησης.<sup>55,56,57</sup>

1. Με τα διαδερμικά συστήματα αποφεύγονται οι περιορισμοί της ενδοφλέβιας θεραπείας καθώς η διαδερμική χορήγηση προσεγγίζει τη μηδενική τάξη εισόδου φαρμάκων που είναι ισοδύναμη με τη χορήγηση μέσω συνεχούς ενδοφλέβιας έγχυσης χωρίς τους κινδύνους που φέρει η τελευταία.
2. Η διαδερμική οδός, έναντι της γαστρεντερικής οδού, ελαχιστοποιεί σε μεγάλο βαθμό τη μεταβλητότητα της απορρόφησης του φαρμάκου που οφείλεται σε αλλαγή του pH, επίδραση της τροφής, μεταβολή του χρόνου εκκένωσης του στομάχου, μεταβολή της εντερικής κινητικότητας και επίδρασης των βακτηριακών ενζύμων, και διατηρούνται σταθερά τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα.
3. Τα TDDS επιτρέπουν στο φάρμακο να εισέλθει στη γενική κυκλοφορία κατευθείαν μετά τη διαδερμική απορρόφηση και, έτσι, αποφεύγεται ο μεταβολισμός πρώτης διόδου από το ήπαρ, ιδιαίτερα σημαντικό για φάρμακα με υψηλή ηπατική κάθαρση.
4. Η αποφυγή της στοματικής οδού όταν δεν είναι επιθυμητή, η ικανότητα για πολυήμερες θεραπείες με μία μόνο εφαρμογή, η ανώδυνη χορήγηση και ο γρήγορος τερματισμός της με απλή αφαίρεση, συμβάλλουν στην καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς.
5. Ο ελεγχόμενος ρυθμός αποδέσμευσης του φαρμάκου για μεγάλο χρονικό διάστημα, μειώνει την πιθανότητα υπερβολικής ή μικρότερης δόσης. Ως αποτέλεσμα, αποφεύγονται ανεπιθύμητες ενέργειες ή τοξικά φαινόμενα και εξασφαλίζονται σταθερά επίπεδα στο πλάσμα, ακόμη και για φάρμακα με μικρό χρόνο ημιζωής.

Αν και η διαδερμική χορήγηση φαρμάκων εμφανίζει εντυπωσιακά πλεονεκτήματα, δημιουργούνται, παράλληλα, και κάποιοι περιορισμοί κατά την κλινική εφαρμογή των διαδερμικών συστημάτων που σχετίζονται με το δερματικό φραγμό και τις αλληλεπιδράσεις των φαρμάκων με αυτόν.<sup>14,44,55,58</sup>

1. Το δέρμα ως ανοσολογικό όργανο μπορεί να αντιδράσει στο φάρμακο, στα έκδοχα, ή στα συστατικά της συσκευής χορήγησης και, ως εκ τούτου, η διαδερμική οδός δεν είναι κατάλληλη για φάρμακα που είναι ικανά να το ερεθίσουν.
2. Η ικανότητα επικόλλησης του διαδερμικού επιθέματος εξαρτάται από την κατάσταση του δέρματος και επηρεάζεται αρνητικά όταν αυτό είναι παθολογικό.
3. Λόγω της λειτουργίας φραγμού της κεράτινης στιβάδας, ορισμένα μόνο φαρμακομόρια μπορούν να μορφοποιηθούν σε διαδερμικό θεραπευτικό σύστημα (Πίνακας 1). Συνήθως επιλέγονται φαρμακευτικές ουσίες για τις οποίες απαιτούνται χαμηλές συγκεντρώσεις της στο αίμα ώστε να υπάρξει θεραπευτικό αποτέλεσμα.

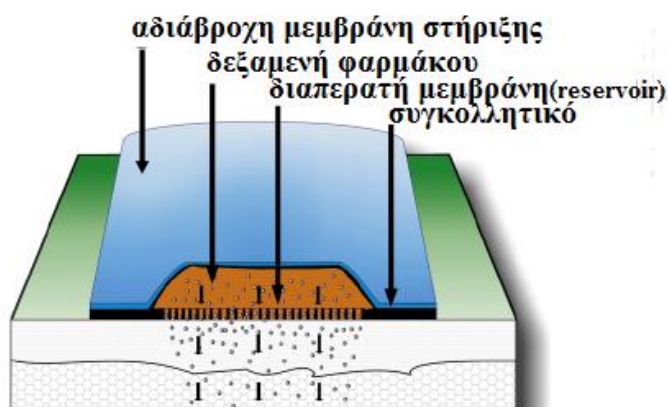
<b>ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ</b>	<b>ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ</b>
<b>Δόση</b>	<b>λιγότερο από 20mg/ημέρα</b>
<b>Χρόνος ημιζωής</b>	<b>&lt;10 ώρες</b>
<b>Μοριακό βάρος</b>	<b>&lt;400Dalton</b>
<b>Σημείο τήξης</b>	<b>&lt;200°C</b>
<b>Συντελεστής κατανομής</b>	<b>1-4</b>
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	<b>&gt;1mg/mL</b>
<b>pH υδατικού κορεσμένου δ/τος</b>	<b>5-9</b>
<b>Συντελεστής διαπερ/τας δέρματος</b>	<b>&gt;0,5x10<sup>-3</sup>cm/h</b>
<b>Αντίδραση στο δέρμα</b>	<b>μη ερεθιστική</b>
<b>Από του στόματος βιοδιαθε/τητα</b>	<b>χαμηλή</b>

Πίνακας 1<sup>59</sup>: Ιδανικές ιδιότητες υποψήφιων φαρμάκων για διαδερμική χορήγηση.

### 2.3 Βασικά συστήματα διαδερμικής χορήγησης

Τα διαδερμικά συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης (Εικόνα 10) τυπικά περιλαμβάνουν <sup>47,60,61</sup>:

- Ένα εξωτερικό περίβλημα, το οποίο αφαιρείται πριν την εφαρμογή και ο ρόλος του είναι προστατευτικός.
- Μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες σε μορφή διαλύματος.
- Επιταχυντές διαβατότητας, με σκοπό την αύξηση της διαπερατότητα της ουσίας.
- Πίεσο-ευαίσθητα συγκολλητικά επαφής (PSA), πχ. ακρυλικά, σιλικόνες, τα οποία εφαρμόζονται σε ορισμένη ή όλη την επιφάνεια του συστήματος με σκοπό την προσκόλληση του έμπλαστρου στο δέρμα.
- Μία διαπερατή μεμβράνη, η οποία καθορίζει το ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου (υπάρχει μόνο στα συστήματα δεξαμενής).
- Μια αδιάβροχη μεμβράνη στήριξης, πχ. παράγωγα κυτταρίνης, πολυβινυλαλκοόλη, προπυλένιο σιλικόνης, η οποία προστατεύει το διαδερμικό επίθεμα από το εξωτερικό περιβάλλον.



Εικόνα 10<sup>62</sup>: Βασικά τμήματα διαδερμικού επιθέματος.

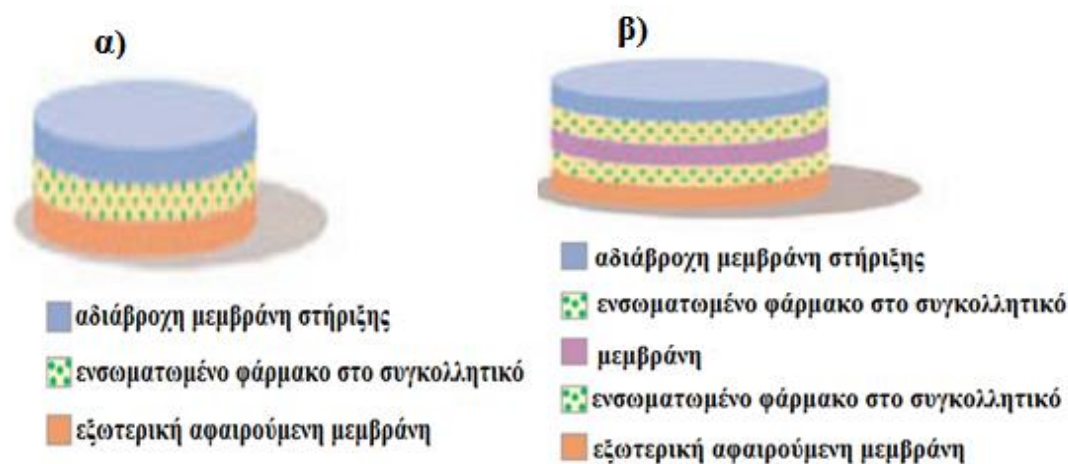
Τα συστήματα διαδερμικής παροχής φαρμάκου (TDDSs), ανάλογα με το που βρίσκεται η δραστική ουσία, χωρίζονται σε τρία βασικά σχέδια<sup>63</sup>: τα συστήματα ελεγχόμενης μεμβράνης ή αλλιώς δεξαμενής (reservoir devices, RPS), τα συστήματα μήτρας (matrix devices, ME), και τα συστήματα στα οποία το φάρμακο ενσωματώνεται στο συγκολλητικό (drug – in–adhesive devices, DIAPs). Επίσης, υπάρχουν και τα συστήματα microreservoir (microreservoir devices, MDD) που συνδυάζουν τις αρχές των συστημάτων δεξαμενής και μήτρας.

### 2.3.1 Συστήματα στα οποία το φάρμακο ενσωματώνεται στη συγκολλητική στιβάδα (DIAPs)

Αν συγκρίνουμε τα χαρακτηριστικά των τριών σχεδίων, τα DIAPs είναι σίγουρα πιο απλά σε δομή και ανώτερα από την άποψη της συμμόρφωσης του ασθενούς και του εμπορίου.<sup>63</sup>

Τα DIAPs χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες<sup>64</sup>, τα απλά συστήματα, ή αλλιώς μονής επίστρωσης, και τα σύνθετα συστήματα, ή αλλιώς πολλαπλών επιστρώσεων (Εικόνα 11). Σε αυτόν τον τύπο επιθέματος, το συγκολλητικό στρώμα όχι μόνο εξυπηρετεί στην προσκόλληση των διαφόρων στρωμάτων μεταξύ τους και με το δέρμα, αλλά είναι επίσης υπεύθυνο για την αποδέσμευση του φαρμάκου.

Το σύστημα πολλαπλών επιστρώσεων είναι παρόμοιο με αυτό της μονής επίστρωσης, αλλά διαθέτει δύο συγκολλητικές στιβάδες, αντί για μία, διαχωριζόμενες από μία μεμβράνη. Η μία στιβάδα είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση του φαρμάκου και η άλλη για την ελεγχόμενη αποδέσμευσή του από τη δεξαμενή.

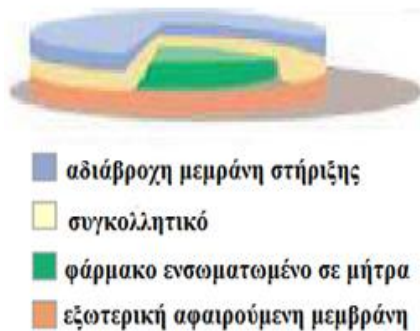


Εικόνα 11<sup>65</sup>: Αποτελούμενα μέρη DIAP συστήματος α) μονής επίστρωσης και β) πολλαπλών επιστρώσεων.

### 2.3.2 Συστήματα τύπου μήτρας (Matrix Systems)

Στα συστήματα τύπου μήτρας<sup>66</sup>, ή αλλιώς μονολιθικά συστήματα, (Εικόνα 12) το φάρμακο διασπείρεται ομοιογενώς σε μία υδρόφιλη ή λιπόφιλη πολυμερική μήτρα η οποία λειτουργεί σα δεξαμενή του φαρμάκου και ρυθμίζει την απελευθέρωση του μέσω διάχυσης. Η αποδέσμευσή της φαρμακευτικής ουσίας γίνεται συνήθως με κινητική μηδενικής τάξεως, αν και εξαρτάται από της φυσικοχημικές ιδιότητες τόσο της ουσίας όσο και της μήτρας.





Εικόνα 12<sup>65</sup>: Αποτελούμενα μέρη συστήματος μήτρας.

### 2.3.3 Συστήματα τύπου δεξαμενής (Reservoir Systems)

Στα συστήματα τύπου δεξαμενής, το φάρμακο αποθηκεύεται σε μία δεξαμενή η οποία βρίσκεται μεταξύ της μεμβράνης στήριξης και μίας μικροπορώδης ή μη πορώδης πολυμερικής μεμβράνης που ελέγχει το ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου (Εικόνα 13).<sup>67</sup> Το φάρμακο στην δεξαμενή μπορεί να είναι υπό τη μορφή εναιωρήματος, διαλύματος, γέλης ή υπό μορφή διασποράς.<sup>66</sup>

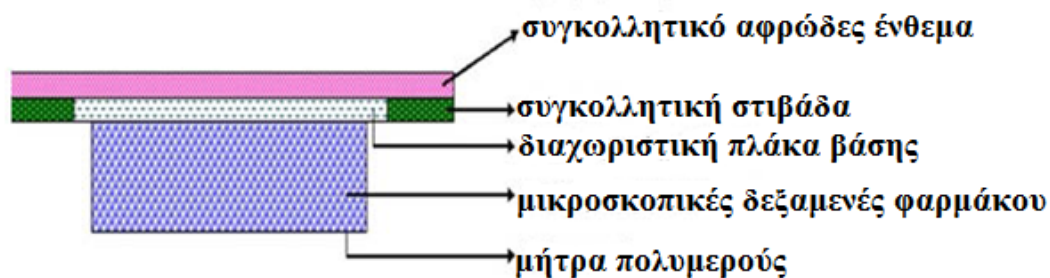


Εικόνα 13<sup>65</sup>: Αποτελούμενα μέρη συστήματος δεξαμενής.

### 2.3.4 Συστήματα microreservoir (microreservoir patches)

Τα συστήματα microreservoir<sup>68</sup> είναι ένα υβρίδιο των συστημάτων δεξαμενής και μήτρας (Εικόνα 14). Η δεξαμενή φαρμάκου σχηματίζεται, αρχικά, με τη διασπορά της στερεής φαρμακευτικής ουσίας σε ένα υδατικό διάλυμα υδρόφιλου διαλυτοποιητή, π.χ. προπυλενογλυκόλη, στη συνέχεια, το σχηματιζόμενο διάλυμα διασπείρεται ομοιόμορφα σε ένα λιπόφιλο πολυμερές και, τελικά, σχηματίζονται χιλιάδες μικροσκοπικές δεξαμενές φαρμάκου μέσα στη μήτρα του πολυμερούς. Η ποσότητα του φαρμάκου που αποδεσμεύεται εξαρτάται από τη διαλυτότητα του

φαρμάκου στο υγρό διαμέρισμα, το μέγεθος και τη δομή του πολυμερούς και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του συστήματος.



Εικόνα 14<sup>69</sup>: Αποτελούμενα μέρη συστήματος microreservoir.

## 2.4 Επιθυμητά χαρακτηριστικά διαδερμικών συστημάτων

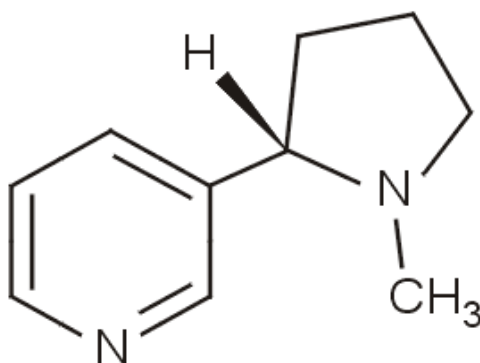
Τα ιδανικά χαρακτηριστικά ενός διαδερμικού επιθέματος είναι τα παρακάτω<sup>71</sup>:

- Χρόνος ζωής του προϊόντος έως 2 χρόνια
- Σταθερή και ακριβής βιοφαρμακευτική απόδοση στο ίδιο άτομο και μεταξύ διαφορετικών ατόμων
- Αισθητικά αποδεχτό
- Απλή συσκευασία και εύκολα βήματα τοποθέτησης
- Κατάλληλο μέγεθος, περίπου κάτω από 40 cm<sup>2</sup>
- Κατάλληλη συχνότητα χορήγησης, από μία φορά την ημέρα έως μία φορά την εβδομάδα
- Να μην προκαλεί μη αποδεκτές δερματικές αντιδράσεις
- Εύκολη απομάκρυνση της εξωτερικής αφαιρούμενης μεμβράνης
- Επαρκής συγκόλληση και εύκολη απομάκρυνση από το δέρμα
- Να μην αφήνει κατάλοιπα στο δέρμα μετά την αφαίρεσή του

## 2.5 Διαδερμικό σύστημα νικοτίνης

Τα συστήματα διαδερμικής χορήγησης νικοτίνης είναι ένα βοήθημα για τη διακοπή του καπνίσματος, σχεδιασμένο να παρέχει νικοτίνη στη συστηματική κυκλοφορία μέσω του δέρματος.<sup>72</sup> Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, ο FDA ενέκρινε τέσσερα διαφορετικά TDS νικοτίνης ως ενισχυτικά στη διακοπή του καπνίσματος.

Η νικοτίνη είναι κατάλληλος υποψήφιος για διαδερμική θεραπεία επειδή είναι πτητική, λιπόφιλη, και διαπερνά εύκολα το δέρμα. Είναι ένα παράγωγο τριτοταγούς αμίνης, διαλυτή στο νερό και τα λίπη ( $\log K_{ow} = 1,17$ ), με μοριακό βάρος 162.23. Η χημική δομή της νικοτίνης περιέχει δύο ιονιζόμενες ομάδες, ένα δακτύλιο πυριδίνης και ένα δακτύλιο πυρρολιδίνης με τιμές  $pK_a$  3,04 και 7,84, αντίστοιχα (Εικόνα 15).<sup>73</sup> Ενεργώντας ως ασθενής βάση, η νικοτίνη είναι λιγότερο ιονισμένη και διαπερνά μεμβράνες πιο εύκολα σε αλκαλικά διαλύματα.<sup>74</sup>



Εικόνα 15<sup>75</sup>: Χημική δομή νικοτίνης.

Η νικοτίνη είναι ένα χολινεργικός ανταγωνιστής ο οποίος συνδέεται με τους υποδοχείς ακετυλοχολίνης στο περιφερειακό και κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), ενεργοποιεί διάφορες νευροχημικές διεργασίες, συμβάλλοντας, τελικά, στην ανάπτυξη του εθισμού.<sup>72,76</sup> Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι οι χολινεργικές διαδικασίες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη γνωστική λειτουργία και, ως εκ τούτου, ασθένειες στις οποίες η εξασθένηση των γνωστικών δεξιοτήτων αποτελεί σημαντικό σύμπτωμα, όπως το Alzheimer και η νόσος Πάρκινσον, συνδέονται με σημαντική απώλεια υποδοχέων νικοτίνης.<sup>77</sup>

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας υποκατάστασης της νικοτίνης για την ανακούφιση της επιθυμίας τσιγάρου χρησιμοποιώντας TDS, εξαρτάται από τη δοσολογία, η οποία καθορίζει τα επίπεδα νικοτίνης στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της ημέρας.<sup>76</sup> Η νικοτίνη μεταβολίζεται εκτεταμένα, κυρίως στο ήπαρ, με την κοτινίνη να είναι ο μείζον μεταβολίτης ο οποίος αν και βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με τη νικοτίνη, δεν φαίνεται να συνεισφέρει στα αποτελέσματα

της τελευταίας.<sup>72</sup> Δεδομένου ότι τα περισσότερα σκευάσματα NRT δεν φτάνουν τα ίδια επίπεδα νικοτίνης στο πλάσμα με τα τσιγάρα, ένας τρόπος βελτίωσης είναι η αύξηση της δόσης της νικοτίνης η οποία μπορεί να ωφελήσει ιδιαίτερα τους περισσότερο εξαρτημένους καπνιστές.<sup>78</sup> Τα συστήματα είναι διαθέσιμα για εφαρμογή 16- και 24-ωρών σχημάτων, και συνιστώνται για καθημερινή χρήση για διάστημα έως 20 εβδομάδες.<sup>72</sup> Κατά κανόνα, μία θεραπεία αποτελείται από καθημερινή εφαρμογή στο δέρμα για διάρκεια 4-8 εβδομάδων, προκειμένου το σύστημα να παραδώσει μια δόση προσαρμοσμένη στο επίπεδο του εθισμού (η οποία συνήθως αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο TDS) και ακολουθεί σταδιακή απόσυρση της θεραπείας, που συνίσταται στη μείωση της δόσης κάθε 2-4 εβδομάδες, χρησιμοποιώντας μικρότερα TDS.<sup>76</sup>

Η ευκολία στη χρήση και η διακριτική φύση των συστημάτων έχουν οδηγήσει σε υψηλό βαθμό συμμόρφωση του ασθενούς παρά την πιθανή πρόκληση ανεπιθύμητων ενεργειών όπως τοπικοί ερεθισμοί, διαταραχές του ύπνου και του κεντρικού νευρικού συστήματος.<sup>72</sup>

Πέρα από τα TDDS, σήμερα διατίθενται στο εμπόριο διάφορες μορφές νικοτίνης για συμπλήρωμα της διακοπής του καπνίσματος όπως τσίχλες, ρινικά σπρέι και συσκευές εισπνοών.<sup>77</sup>

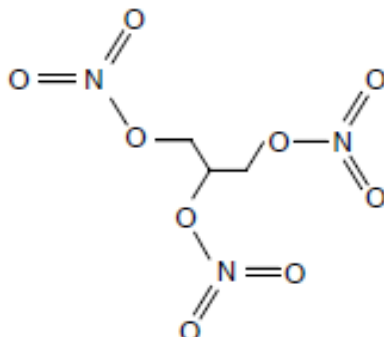
## **2.6 Διαδερμικό σύστημα νιτρογλυκερίνης**

Τα συστήματα διαδερμικής χορήγησης νιτρογλυκερίνης (NTG) χρησιμοποιούνται πάνω από εκατό χρόνια για προφύλαξη από τη στηθάγχη και για θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας, και είναι σχεδιασμένα να παρέχουν νιτρογλυκερίνη στην κυκλοφορία του αίματος μέσω του δέρματος.<sup>79,80</sup>

Η στηθάγχη είναι η εκδήλωση διαταραχής λόγω της ανεπαρκούς οξυγόνωσης της καρδιάς που οφείλεται σε στένωση των στεφανιαίων αγγείων. Τα συμπτώματα είναι διακεκομμένος προκάρδιος πόνος, μικρής διάρκειας. Η νιτρογλυκερίνη, γνωστό αγγειοσταλτικό, διευρύνει τα αιμοφόρα αγγεία και, έτσι, διευκολύνει την καρδιακή λειτουργία.<sup>81</sup>

Η νιτρογλυκερίνη έχει μικρό χρόνο ημιζωής (περίπου 2,8 λεπτά), υψηλό όγκο κατανομής (3,3 λίτρα / kg), και υψηλή κάθαρση στο πλάσμα (0,72 λίτρα / min / kg).<sup>55</sup> Όταν λαμβάνεται από το στόμα μεταβολίζεται ταχέως από το ήπαρ. Λόγω, λοιπόν, του εκτεταμένου μεταβολισμού πρώτης διόδου, η στοματική χορήγηση της νιτρογλυκερίνης είναι ακατάλληλη για παρατεταμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα, όπως

αυτό απαιτείται, και προτιμάται η διαδερμική οδός.<sup>63,82</sup> Τόσο η λιπόφιλη φύση της ( $\log P_{o/w}=1,6$ ) όσο και το μικρό μοριακό βάρος της (227,1), κάνουν τη νιτρογλυκερίνη κατάλληλο υπογήφιο μόριο για TDDS (Εικόνα 16).<sup>83</sup>



Εικόνα 16<sup>84</sup>: Χημική δομή νιτρογλυκερίνης.

Στην αγορά διατίθενται διαδερμικά επιθεμάτια διαφόρων περιοχών επιφάνειας και περιεκτικότητας νιτρογλυκερίνης για εφαρμογή 24-ωρών σχημάτων.<sup>33</sup> Στα συστήματα αυτά, η NTG δεν είναι διαθέσιμη σε καθαρή κρυσταλλική δομή αλλά προσροφημένη σε λακτόζη (10% NTG).<sup>55</sup> Επαρκής ποσότητα νιτρογλυκερίνης προσροφάται στην λακτόζη κάθε μήτρας για να διατηρηθεί η πρώτη στη ρευστή φάση σε ένα σταθερά κορεσμένο επίπεδο. Οι κρύσταλλοι της λακτόζης λειτουργούν ως δεξαμενές του φαρμάκου για τη διατήρηση του κορεσμένου φαρμάκου στην ρευστή φάση.<sup>33</sup>

Ωστόσο, ένα σημαντικό ζήτημα είναι η συνεχής δοσολογία της νιτρογλυκερίνης όπως αυτή προβλέπεται από τα TDDS. Έχει διαπιστωθεί ότι η NTG είναι ένα φάρμακο στο οποίο μπορεί να αναπτυχθεί ανοχή, με αποτέλεσμα να τίθεται σε κίνδυνο η αποτελεσματικότητα των συστημάτων όταν αυτά χρησιμοποιούνται συνεχώς για περισσότερο από 12 ώρες την ημέρα.<sup>83</sup>

Παρενέργειες της νιτρογλυκερίνης είναι πονοκέφαλοι, αυξημένες εντερικές κινήσεις, μείωση της γενετήσιας ορμής και επώδυνη διούρηση.<sup>85</sup>

Πέρα από τα TDDS, η νιτρογλυκερίνη χορηγείται υπό τη μορφή υπογλώσσιων δισκίων, σπρέι, ενέσιμου διαλύματος και αλοιφής (σε ποσοστό 2%).<sup>79,86</sup>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

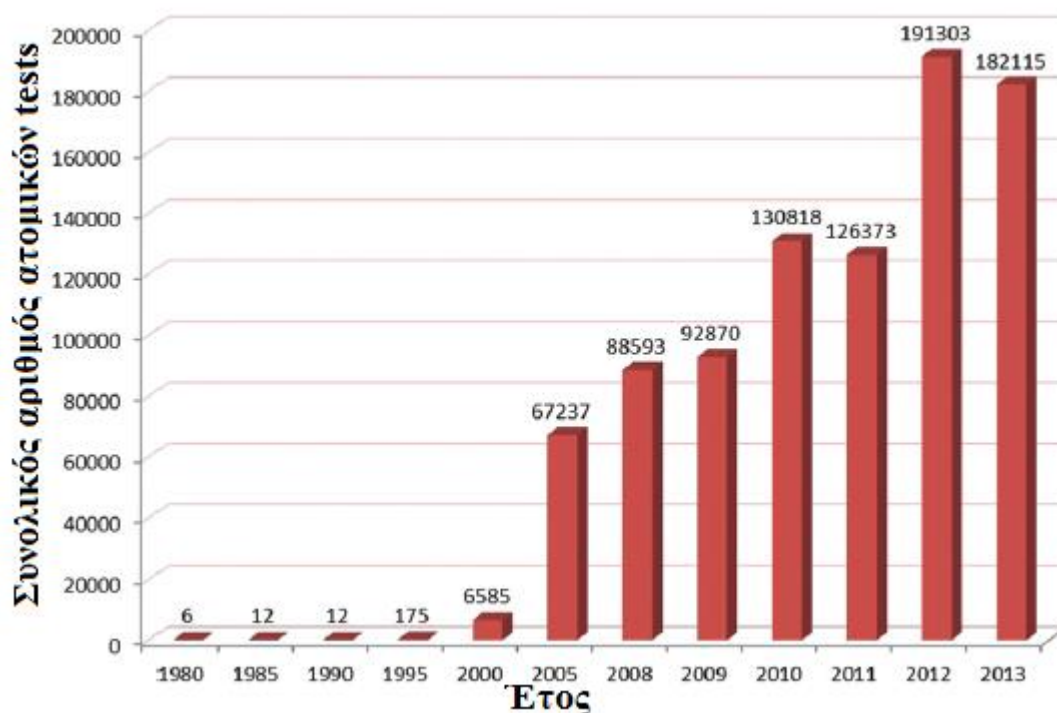
### ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ

#### 3.1 Εισαγωγή

Ένα βασικό κλειδί της φαρμακευτικής ανάπτυξης νέων υποψήφιων φαρμακομορίων είναι οι προκλινικές δοκιμές οι οποίες εξαρτώνται από μια διαδοχική σειρά *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* και *in vivo* δοκιμασιών πριν τη χορήγηση σε ανθρώπους.<sup>87</sup> Οι δοκιμές αυτές αποτελούν κανονιστική απαίτηση για να μπορέσει ένα φάρμακο να προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές και περιλαμβάνουν την αξιολόγηση του κινδύνου των χημικών ουσιών, όταν αυτά έρθουν σε επαφή με το δέρμα, και την θεραπευτική εκτίμηση των διαδερμικών συστημάτων. Κατά την εφαρμογή διαδερμικών συστημάτων πραγματοποιούνται πολύπλοκες διαδικασίες, οι οποίες βασίζονται στην κίνηση των μορίων από την εξωτερική επιφάνεια του δέρματος εντός της συστηματικής κυκλοφορίας.<sup>88</sup> Συγκεκριμένα, η απορρόφηση των διαδερμικών φαρμακευτικών προϊόντων περιλαμβάνει δύο διαδοχικές διαδικασίες, την απελευθέρωση του φαρμάκου από το επίθεμα και την απορρόφηση του στο σημείο εφαρμογής μέσω του δέρματος. Επομένως, η τοπική βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου εξαρτάται, τουλάχιστον εν μέρει, από το ρυθμό απελευθέρωσης του από το προϊόν.<sup>89</sup>

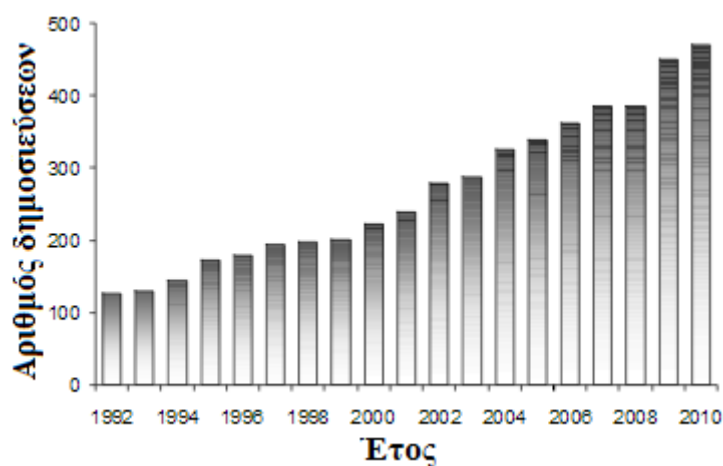
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της διαδερμικής διαπερατότητας και απορρόφησης κυμαίνονται από *in vivo* συστήματα, τα οποία καλύπτουν το πλήρες φάσμα των φυσιολογικών διαδικασιών, έως τις απλές *in vitro* μεθόδους και τα προσεγγιστικά μοντέλα.<sup>88</sup> Τα *in vivo* πειράματα παρέχουν ρεαλιστικές πληροφορίες σχετικά με το ποσό της χημικής ουσίας που εφαρμόζεται τοπικά, απορροφάται διαμέσου του δέρματος και το οποίο την καθιστά βιοδιαθέσιμη. Κατά την *in vivo* εκτίμηση της διαδερμικής απορρόφησης αναλύονται ανθρώπινα ή ζωικά σωματικά υγρά και, εν συνεχεία, εκτιμάται η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η κάθαρση του φαρμακευτικού προϊόντος.<sup>90,91</sup> Αυτό, ωστόσο, είναι εξαιρετικά δύσκολο να γίνει για ένα ευρύ φάσμα πιθανών δεισδυτικών ουσιών-όχι μόνο για τοξικολογικούς λόγους, αλλά και λόγω της μη διαθεσιμότητας των εθελοντών και της αυξανόμενης πίεσης για τη μείωση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται στις κλινικές δοκιμές.<sup>88,91</sup> Για αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί και επικυρωθεί *in vitro* μέθοδοι, και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν αντικαταστήσει ή

μειώσει τη χρήση ορισμένων in vivo δοκιμών, ενώ γίνονται ολοένα και πιο αποδεκτές από τους κανονιστικούς οργανισμούς. (Σχήμα 6).<sup>87,88</sup>



Σχήμα 6<sup>87</sup>: Συνολική αύξηση της χρήσης in vitro μεθόδων στη φαρμακευτική βιομηχανία (n=6) μεταξύ 1980 και 2013.

Μάλιστα, κατά την τελευταία δεκαετία, ο αριθμός των δημοσιεύσεων που υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με τη διείσδυση μορίων μέσω της ανθρώπινης επιδερμίδας αυξήθηκε στο διπλάσιο (Σχήμα 7).<sup>92</sup>



Σχήμα 7<sup>92</sup>: Αριθμός δημοσιεύσεων με λέξεις κλειδιά την 'ανθρώπινη επιδερμίδα' και τη 'διαπέραση' στο Science Direct τις δύο τελευταίες δεκαετίες.

Πρώτα διεξάγονται οι *in vitro* μέθοδοι, ως μέρος μιας ιεραρχικής στρατηγικής δοκιμών, συμπληρώνοντας τις *in vivo* έρευνες που διεξάγονται αργότερα σε ζώα ή ανθρώπους, η λεγόμενη και ως *in vivo-in vitro* συσχέτιση, για να επιβεβαιώσουν τον κύριο μηχανισμό δράσης του φαρμάκου, και στη συνέχεια να καθορίσουν το φαρμακολογικό, φαρμακοκινητικό και τοξικολογικό του αποτέλεσμα.<sup>90,91</sup> Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του FDA η *in vitro-in vivo* συσχέτιση (IVIVC) διακρίνεται σε συσχετίσεις επιπέδου A, B, C, D και πολλαπλές συσχετίσεις επιπέδου C. Το υψηλότερο επίπεδο συσχέτισης, δηλαδή το επίπεδο που παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες, αναφορικά με την *in vivo* διαδικασία και πιθανώς με τους παράγοντες που την επηρεάζουν, είναι το επίπεδο A, ενώ το χαμηλότερο, είναι το επίπεδο C.<sup>157</sup> Στην πραγματικότητα, οι *in vitro* μελέτες διάχυσης φαρμάκων μιμούνται το *in vivo* σενάριο και, ως εκ τούτου, υπάρχουν διάφοροι περιορισμοί στην προέκταση των *in vitro* δεδομένων σε *in vivo* καταστάσεις τόσο σε φαρμακολογικές όσο και σε τοξικολογικές ανακαλύψεις κατά τη διαδικασία ανάπτυξης IVIVC.<sup>90,91,157</sup>

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα από τη χρήση των *in vitro* μεθόδων. Συνήθως, είναι απλές στο χειρισμό, οικονομικές, αποδίδουν γρήγορα αποτελέσματα, αναπαράγονται, ποσοτικοποιούνται και αυτοματοποιούνται εύκολα, παρέχοντας, ταυτόχρονα, ένα περιβάλλον στο οποίο οι μεταβλητές μπορούν να ελεγχθούν προσεκτικά.<sup>90</sup> Με τις *in vitro* μεθόδους μέτρησης διαδερμικής απορρόφησης, μειώνονται ή αντικαθίστανται οι δοκιμές σε ζώα και ανθρώπους, καθότι χρησιμοποιούνται επικυρωμένες εναλλακτικές λύσεις, όπως η χρήση τεχνητών μεμβρανών ή δέρματος που έχει υποστεί χειρουργική εκτομή, και, έτσι, εξαλείφονται τυχόν ηθικοί περιορισμοί. Επιπλέον, μπορεί να μελετηθεί *in vitro* η κατανομή των χημικών ουσιών στο δέρμα με τη χρήση μεθόδων όπως η τεχνική *tape stripping*.<sup>88</sup> Ως συνέπεια, αποτελούν μεθόδους ελέγχου «υψηλής απόδοσης», και βρίσκουν ιδιαίτερη χρήση στη βασική έρευνα ανακάλυψης φαρμάκων.<sup>90</sup>

Μειονεκτήματα της χρήσης *in vitro* μεθόδων για τη μελέτη της διαδερμικής απορρόφησης περιλαμβάνουν η έλλειψη παροχής φαρμακοκινητικών δεδομένων, και η δυσκολία απόκτησης ανθρώπινου δέρματος σε επαρκείς ποσότητες. Συνήθως, οι τεχνητές μεμβράνες έχουν περιορισμένη χρήση για την πρόβλεψη της διαδερμικής απορρόφησης στον άνθρωπο ενώ η χρήση ζωικού δέρματος καταλήγει συχνά σε μία υπερεκτιμημένη πρόβλεψη.<sup>88</sup>



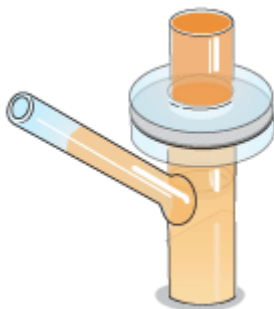
## **3.2 In vitro μέθοδοι**

### **3.2.1 Κύτταρα διάχυσης (diffusion cells)**

Οι συσκευές διάχυσης χρησιμοποιούνται ευρέως προκειμένου να αξιολογηθεί η διαπέραση ουσιών μέσω του δέρματος. Είναι εμπορικώς διαθέσιμη μια ποικιλία κυττάρων διαχύσεως τα οποία ανάλογα με την κατασκευή τους χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τα στατικά κύτταρα, κάθετου ή οριζόντιου σχεδιασμού, και τα flow through κύτταρα.<sup>93</sup> Οι συσκευές αυτές εμφανίζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Αποτελούνται από δύο διαμερίσματα, το διαμέρισμα του δότη και του δέκτη, τα οποία χωρίζονται από μία μεμβράνη (ή ανθρώπινο δέρμα ή ζωικό δέρμα ή τεχνητή μεμβράνη). Το διαμέρισμα του δότη περιέχει το σκεύασμα με την υπό εξέταση διαπεραστική ουσία, το οποίο εισάγεται στην αρχή του πειράματος. Η διεισδυτική ουσία διαχέεται διαμέσου της μεμβράνης και περνά στο διαμέρισμα του υποδοχέα.<sup>94</sup> Εκτός από τη μέτρηση της ποσότητας και του ρυθμού με τον οποίο η ουσία διαπερνά τη μεμβράνη και διέρχεται στη φάση του υποδοχέα, το πείραμα επίσης παρουσιάζει το πόσο της ουσίας που έχει περάσει μέσα από τη μεμβράνη και έχει παραμείνει εκεί μετά το τέλος του πειράματος. Έτσι, το πείραμα είναι ουσιαστικά μια παθητική διαδικασία διάχυσης που διέπεται από το βαθμό διάχυσης κατά μήκος της μεμβράνης και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της διαπεραστικής ουσίας.<sup>91</sup>

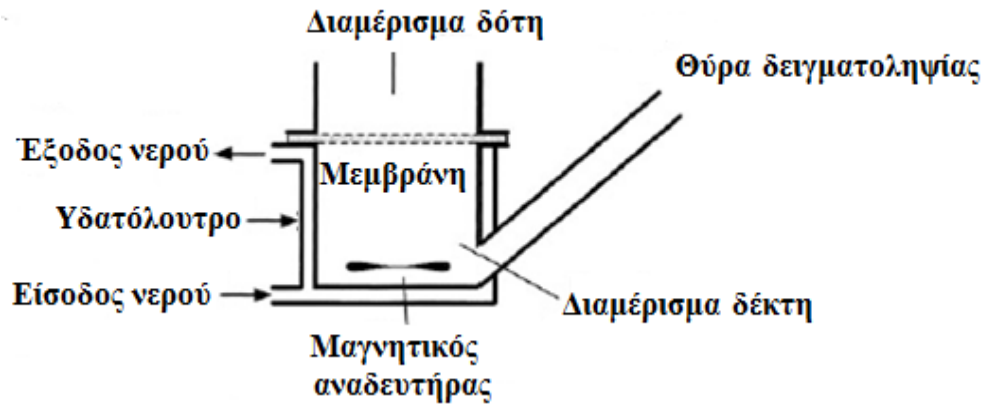
#### **3.2.1.1 Στατικά κύτταρα διάχυσης (static diffusion cells)**

Στη συντριπτική πλειοψηφία, τα in vitro πειράματα διαδερμικής απορρόφησης, διεξάγονται χρησιμοποιώντας κάθετα στατικά κύτταρα διάχυσης, που είναι γνωστά ως Franz κύτταρα (Εικόνα 17).<sup>95</sup> Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό με τον οποίο οι χημικές ουσίες διαπερνούν το ανθρώπινο δέρμα, πχ. η ύπαρξη πληγών, η θέση του σώματος, η ηλικία και το φύλο, οι οποίοι δεν μπορούν να ληφθούν υπόψη σε ένα μοντέλο.<sup>96</sup> Ουσιαστικά, τα κάθετα κύτταρα διάχυσης Franz θεωρούνται ως το πιο έγκυρο in vitro μοντέλο για την αξιολόγηση της διείσδυσης του δέρματος πληθώρας χημικών ουσιών.<sup>92</sup>



Εικόνα 17<sup>97</sup>: Τυπικό κύτταρο Franz.

Ένα τυπικό κύτταρο Franz είναι κατασκευασμένο από γυαλί και αποτελείται από το διαμέρισμα του δότη και το διαμέρισμα του δέκτη, τα οποία συγκρατούνται στη θέση τους με τη βοήθεια μεταλλικού σφιγκτήρα. Οι θάλαμοι διαχωρίζονται από την ενδιάμεση μεμβράνη από την οποία γίνεται η διάχυση του φαρμάκου (Εικόνα 18).<sup>98</sup> Το διαμέρισμα του δότη βρίσκεται στην πλευρά της μεμβράνης που εφαρμόζεται το σκεύασμα ενώ το διαμέρισμα του δέκτη βρίσκεται στην άλλη πλευρά της μεμβράνης. Ανάλογα με το ποιο σενάριο μιμείται καλύτερα την πραγματική εφαρμογή του φαρμάκου, το διαμέρισμα του δότη μπορεί να είναι ανοιχτό, ημι-ανοιχτό, ή κλειστό ως προς την ατμόσφαιρα.<sup>99</sup> Το κεντρικό μέρος του κυττάρου εμβαπτίζεται σε υδατόλουτρο το οποίο διατηρεί τη θερμοκρασία του συστήματος στους 32°C για να προσομοιώνεται η θερμοκρασία της επιφάνειας του ανθρώπινου δέρματος και να αποφεύγονται διακυμάνσεις της θερμοκρασίας που ίσως επηρεάσουν τη διαπερατότητα των φαρμάκων.<sup>98</sup> Το διαμέρισμα του δέκτη περιέχει ένα υγρό, το λεγόμενο και ως διάλυμα του υποδοχέα (receptor fluid), το οποίο είναι συμβατό με την ακεραιότητα της μεμβράνης, είναι σε θέση να διαλυτοποιήσει την υπό εξέταση ουσία και είναι αντιπροσωπευτικό των φυσιολογικών συνθηκών (π.χ., αλατούχο διάλυμα ή διάλυμα Ringer-διαλύματα buffer ).<sup>99</sup>



Εικόνα 18<sup>91</sup>: Σχηματική αναπαράσταση του κυττάρου διάχυσης Franz και των διαφόρων διαμερισμάτων του.

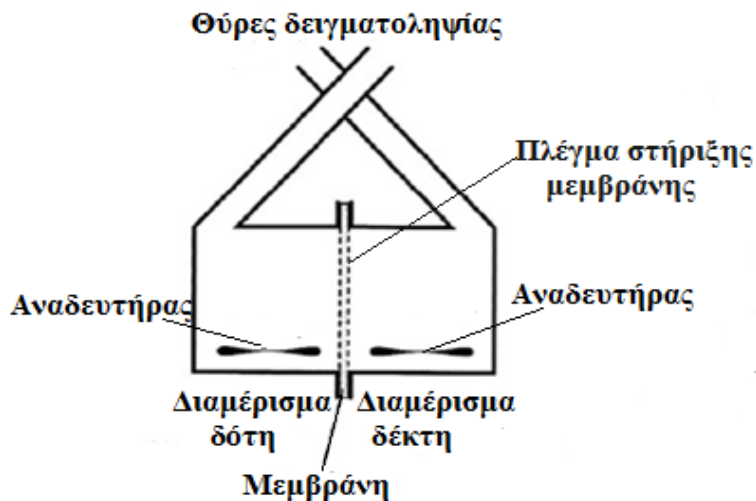
Όταν αρχίζει το πείραμα διάχυσης, η υπό εξέταση ουσία διαχέεται από το θάλαμο του δότη εντός του διαλύματος υποδοχέα μέσω της μεμβράνης. Σε τακτά χρονικά διαστήματα, γίνεται δειγματοληψία στο διάλυμα του υποδοχέα από τον πλευρικό βραχίονα που βρίσκεται στο διαμέρισμα του δέκτη που ορισμένες φορές φράσσεται κατά τη διάρκεια του πειράματος για την αποφυγή εξατμίσεως.<sup>37,91</sup> Σε κάθε δειγματοληψία, το διάλυμα του υποδοχέα αντικαθίσταται με νέο ώστε ο όγκος του να παραμένει σταθερός κατά τη διάρκεια του πειράματος.<sup>37</sup> Οι μικροί όγκοι δειγμάτων που λαμβάνονται πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικοί της συγκέντρωσης της ουσίας σε ολόκληρο τον όγκο του υποδοχέα για να δημιουργηθεί και να διατηρηθεί η διάχυση κατά μήκος της μεμβράνης που χωρίζει τα δύο διαμερίσματα και, ως εκ τούτου, το διάλυμα του υποδοχέα αναδεύεται συνεχώς με τη βοήθεια της μαγνήτη ανάδευσης. Επομένως, σε ένα στατικό κύτταρο διάχυσης, είναι σημαντική η διατήρηση του βαθμού συγκέντρωσης της διαχεόμενης ουσίας ή αλλιώς των συνθηκών δεξαμενής (sink conditions), έτσι ώστε, κατά κανόνα, η συγκέντρωση της να μην ξεπερνάει το 10% του κορεσμένου διαλύματος της στον υποδοχέα.<sup>100</sup> Πρακτικά, εάν η συγκέντρωση της υπό εξέταση ουσίας στον υποδοχέα δεν υπερβαίνει το 10% της κορεσμένη διαλυτότητας, η δόση της στην επιφάνεια της μεμβράνης μπορεί να θεωρηθεί άπειρη δηλαδή η συγκέντρωσή της στην φάση του δότη υφίσταται ελάχιστη ή καμία αλλαγή κατά τη διάρκεια του πειράματος.<sup>91</sup> Τα δείγματα πάνε στη συνέχεια για ανάλυση με σκοπό την εκτίμηση της συγκέντρωσης της διαλυμένης ουσίας που μετανάστευσε από το διαμέρισμα του δότη στο διαμέρισμα του υποδοχέα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης χρησιμοποιούνται για τον

υπολογισμό του συντελεστή διάχυσης και τη ροή.<sup>37</sup> Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται από 6 έως 24 κύτταρα ώστε να εξασφαλίζεται η επαναληψιμότητα.<sup>91</sup>

Η ευρύτατη χρήση των κυττάρων Franz οφείλεται στο χαμηλό κόστος τους και στο ότι η μέθοδος είναι ταχύτατη και επαναλήψιμη. Τα κύτταρα Franz βρίσκονται σε διάφορα σχέδια και μεγέθη και συνεπώς είναι πολύ ευέλικτα στο να επιλεγθούν για συγκεκριμένους σκοπούς. Ο απλός σχεδιασμός τους επιτρέπει την εφαρμογή σκευασμάτων στην επιφάνεια του δέρματος ευρέος φάσματος, συμπεριλαμβανομένων διαλυμάτων, επιθεμάτων, κρεμών, αλοιφών και άλλων ημιστερεών υλικών φαρμακευτικής ή καλλυντικής φύσης.<sup>91</sup>

Ένας από τους κύριους περιορισμούς των κυττάρων Franz είναι η ευαισθησία τους στις συνθήκες δεξαμενής και η σχετικά κακή ανάμιξη του συνολικού όγκου του διαλύματος, που οφείλεται στο στενό σχήμα του κυττάρου και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός στρώματος κάτω από την επιφάνεια του δέρματος.<sup>91</sup>

Μία παραλλαγή των κυττάρων Franz είναι τα side-by-side κύτταρα τα οποία έχουν οριζόντια διάταξη. Αποτελούνται από δύο θαλάμους, το θάλαμο του δέκτη που περιέχει το υπό εξέταση σκεύασμα και το θάλαμο του δέκτη που περιέχει το διάλυμα του υποδοχέα, οι οποίοι διαχωρίζονται από μία μεμβράνη.<sup>101</sup> Τα κύτταρα είναι φτιαγμένα από γυαλί και βρίσκονται σε διάφορους σχεδιασμούς με πιο επικρατέστερο αυτό των Sollfhweland και Barry (Εικόνα 19).<sup>102</sup> Το περιεχόμενο του ενός ή και των δύο θαλάμων αναδεύονται με μαγνητικές ράβδους ανάδευσης, επικαλυμμένες με τεφλόν, για να εξασφαλιστεί επαρκής διασπορά των μορίων του φαρμάκου, να ελαχιστοποιηθούν τα στατικά στρώματα διάχυσης και να αυξηθεί η διαπερατότητα. Η μεμβράνη στηρίζεται με ένα πλέγμα από ανοξείδωτο χάλυβα. Η συσκευή τοποθετείται σε υδατόλουτρο ελεγχόμενης θερμοκρασίας που διατηρεί τη θερμοκρασία στους 32°C. Η δειγματοληψία επιτυγχάνεται μέσω θυρών που βρίσκονται σε κάθε θάλαμο και σφραγίζονται με parafilm αν χρειαστεί.<sup>103</sup>



Εικόνα 19<sup>91</sup>: Σχηματική αναπαράσταση του κυττάρου διάχυσης side-by-side των Sollfhweland και Barry.

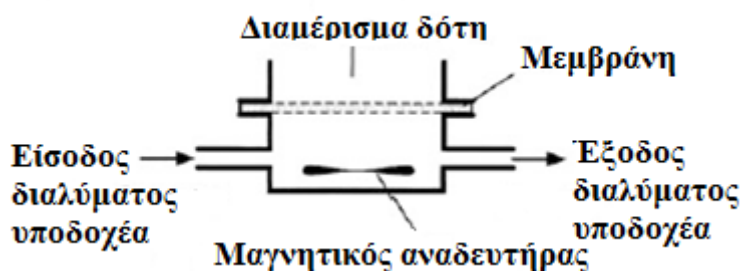
Πλεονεκτήματα των οριζόντιων κυττάρων διάχυσης είναι η καλύτερη ανάδευση και ανάμιξη και στα δύο διαμερίσματα και, ως εκ τούτου ο καλύτερος έλεγχος των συνθηκών του πειράματος, η διεξαγωγή πειράματος άπειρης δόσης και η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Το κυριότερο μειονέκτημά τους είναι ο περιορισμός όσον αφορά τον τύπο του σκευάσματος που μπορεί να εφαρμοστεί σε αυτά.<sup>91</sup>

### 3.2.1.2 Κύτταρα συνεχούς ροής (flow through diffusion cells)

Η άλλη κατηγορία των κυττάρων διάχυσης είναι τα κύτταρα συνεχούς ροής κάθετης διάταξης, ή αλλιώς κύτταρα Bronaugh. Ο βασικός σχεδιασμός τους περιλαμβάνει το διαμέρισμα του δότη και του δέκτη που διαχωρίζονται από μία μεμβράνη. Το διαμέρισμα του δέκτη έχει μία είσοδο και μία έξοδο για να επιτρέπει τη συνεχή ροή του υγρού του υποδοχέα (Εικόνα 20).<sup>104</sup> Κατά τη λειτουργία του κυττάρου συνεχούς ροής, το υγρό του υποδοχέα εισέρχεται στο διαμέρισμα του δέκτη με μία περισταλτική αντλία, συνήθως με ροή 1-2 ml/h, η οποία αποσκοπεί στη μίμηση της ροής του αίματος κάτω από το δέρμα, και αναδύεται ομοιόμορφα με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα.<sup>91,105</sup>

Μετά την έξοδο από το κύτταρο, το υγρό του υποδοχέα εισέρχεται σε ένα σωλήνα από τeflόν και το έκλουσμα που προκύπτει συλλέγεται σε φιαλίδια που βρίσκονται σε έναν αυτόματο συλλέκτη, ο οποίος επιτρέπει την ταυτόχρονη συλλογή από έναν αριθμό κυττάρων.<sup>104,105</sup> Το υγρό του υποδοχέα δεν χρειάζεται αντικατάσταση από τον ερευνητή μετά τη δειγματοληψία καθώς ανανεώνεται αυτόματα μέσω της αντλίας.<sup>91</sup>

Η θερμοκρασία του πειράματος διατηρείται στους 32°C με τη χρήση δεξαμενής νερού ελεγχόμενης θερμοκρασίας.<sup>104</sup>



Εικόνα 20<sup>91</sup>: Αποτελούμενα μέρη κυττάρου διάχυσης συνεχούς ροής.

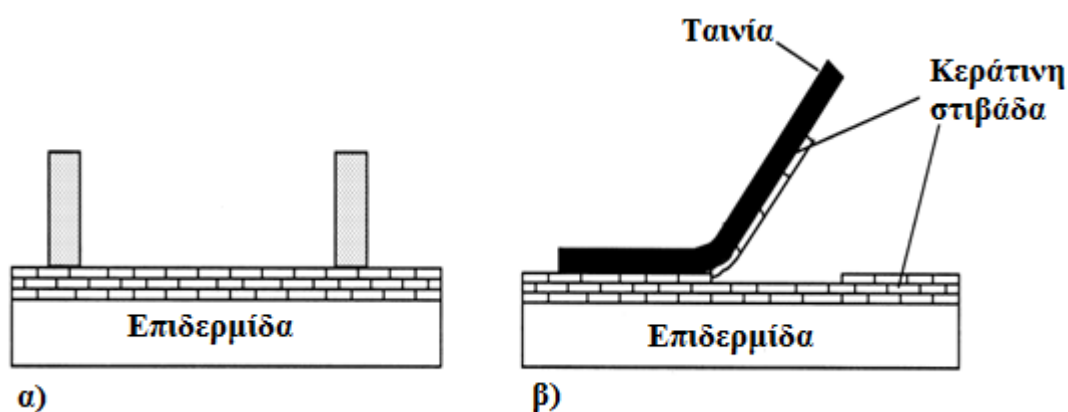
Τα κύτταρα συνεχούς ροής παρέχουν τη δυνατότητα διατήρησης των συνθηκών δεξαμενής καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, λόγω της συνεχούς ροής του υγρού μέσου, ένα ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό για ενώσεις που έχουν υψηλό συντελεστή διαπερατότητας ή ενώσεις χαμηλής διαλυτότητας.<sup>105,106</sup> Επιπλέον, μπορεί να μελετηθεί για μεγάλες χρονικές περιόδους η απελευθέρωση του φαρμάκου από δοσολογικές μορφές, καθώς αυτή η μέθοδος εξαλείφει τα ζητήματα που προκύπτουν από την εξάτμιση όπως συμβαίνει με άλλες συσκευές.<sup>106</sup> Η αυτόματη δειγματοληψία καθιστά τα κύτταρα συνεχούς ροής πολύ πιο βολικά στη χρήση, ιδίως για πειράματα που διεξάγονται επί μακρά χρονικά διαστήματα, και επιτρέπει την εξοικονόμηση έργου και χρόνου.<sup>104,105</sup> Επίσης, μπορούν να μελετηθούν διαφορετικοί τύποι δείγματος και μορφές δοσολογίας καθώς είναι διαθέσιμοι διάφοροι τύποι κυττάρων.<sup>106</sup> Τέλος, είναι πιο εύκολη η ανάπτυξη in vitro-in vivo συσχετίσεων λόγω του ότι μιμούνται καλύτερα τις in vivo συνθήκες.<sup>91,106</sup>

Ενώ τα κύτταρα συνεχούς ροής είναι πιο ευέλικτα σε όρους αυτοματισμού, είναι πιο πολύπλοκα και ουσιαστικά πιο ακριβά από τα κύτταρα Franz. Επιπλέον, είναι δυνατή η απορρόφηση κυρίως υδρόφοβων φαρμάκων από τις πλαστικές σωληνώσεις που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή του υγρού μέσου και ο εγκλωβισμός φυσαλίδων κάτω από την επιφάνεια της μεμβράνης λόγω της ανομοιογενούς ανάμιξης του διαλύματος του δέκτη που οφείλεται στο μεγάλο όγκο του. Κατά συνέπεια, η χρήση των στατικών κυττάρων διάχυσης Franz είναι πιο συχνή από τη χρήση των κυττάρων συνεχούς ροής.<sup>91</sup>

### 3.2.2 Τεχνική tape-stripping

Η τεχνική tape-stripping αποτελεί μία αποτελεσματική μέθοδο αξιολόγησης της ποιότητας και της αποτελεσματικότητας καλλυντικών και δερματολογικών σκευασμάτων.<sup>107,108</sup> Χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της διείσδυσης τοπικών ή διαδερμικών σκευασμάτων εντός της κεράτινης στιβάδας.<sup>107</sup> Αυτή η μη επεμβατική διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί in vivo και in vitro σε ανθρώπους και ζώα.<sup>108</sup> Η μέθοδος χρησιμοποιείται, επίσης, για την παροχή πληροφοριών σχετικά με την κινητική της διαδερμικής χορήγησης φαρμάκου, προσφέροντας μια φαινομενικά εύκολη μέθοδο δειγματοληψίας ιστού του δέρματος, και είναι η βάση της δέρματοφαρμακοκινητικής προσέγγισης του FDA για την αξιολόγηση της τοπικής βιοδιαθεσιμότητας και βιοϊσοδυναμίας.<sup>107</sup>

Μετά την εφαρμογή και τη διείσδυση των σκευασμάτων, τα στρώματα της κεράτινης στιβάδας απομακρύνονται διαδοχικά από την επανειλημμένη εφαρμογή κατάλληλων κολλητικών ταινιών στην ίδια περιοχή του δέρματος (Εικόνα 21).<sup>107,108</sup> Η κολλητική ταινία πιέζεται πάνω στο δέρμα χρησιμοποιώντας ένα ρολό, ώστε να τεντωθεί η επιφάνειά του.<sup>108</sup> Θεωρητικά, η ταινία αφαιρεί ένα στρώμα κερατινοκυττάρων το οποίο περιέχει και το αντίστοιχο ποσό του σκευάσματος που διεισδύει σε αυτά.<sup>107</sup> Συνήθως, όμως, η ποσότητα που απομακρύνεται δεν είναι γραμμικώς ανάλογη με τον αριθμό των ταινιών που χρησιμοποιούνται.<sup>107</sup> Τέλος, το ποσό του σκευάσματος που έχει διεισδύσει στα στρώματα της κεράτινης στιβάδας προσδιορίζεται με τις κλασικές αναλυτικές τεχνικές.<sup>108</sup>



Εικόνα 21<sup>109</sup>: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου tape-stripping. Μετά την εφαρμογή του σκευάσματος στην επιδερμίδα και την απομάκρυνσή του, α), η κεράτινη στιβάδα αφαιρείται διαδοχικά με τη χρήση ταινιών, β).

Παρότι η τεχνική είναι απλή και εύκολη, η ποσότητα της κεράτινης στιβάδας που απομακρύνεται επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους όπως η ενυδάτωση του δέρματος, η συνοχή μεταξύ των κυττάρων, η περιοχή εφαρμογής, οι ενδοατομικές διαφορές, το είδος της ταινίας (διαφορετικό σχήμα, σύνθεση, επιφάνεια, συγκολλητικές ιδιότητες), η διάρκεια της πίεσης πάνω στο δέρμα, η δύναμη με την οποία αφαιρείται και η επιλογή των εφαρμοσμένων ουσιών.<sup>107,108</sup> Μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η έλλειψη κλινικής ασφάλειας/αποτελεσματικότητας και η μη εφαρμογή της σε άρρωστο δέρμα.<sup>110</sup>

Γενικά, η ζύγιση της ταινίας αποτελεί αποδεκτή μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της ποσότητας του υλικού της κεράτινης στιβάδας.<sup>107,111</sup> Αυτή η μέθοδος όμως είναι χρονοβόρα, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σκευάσματα δραστικών ουσιών και, τέλος, η συγκολλητική στιβάδα μπορεί να επηρεάσει τον ακριβή προσδιορισμό του βάρους.<sup>111</sup>

### **3.2.3 Τεχνική μικροδιάλυσης**

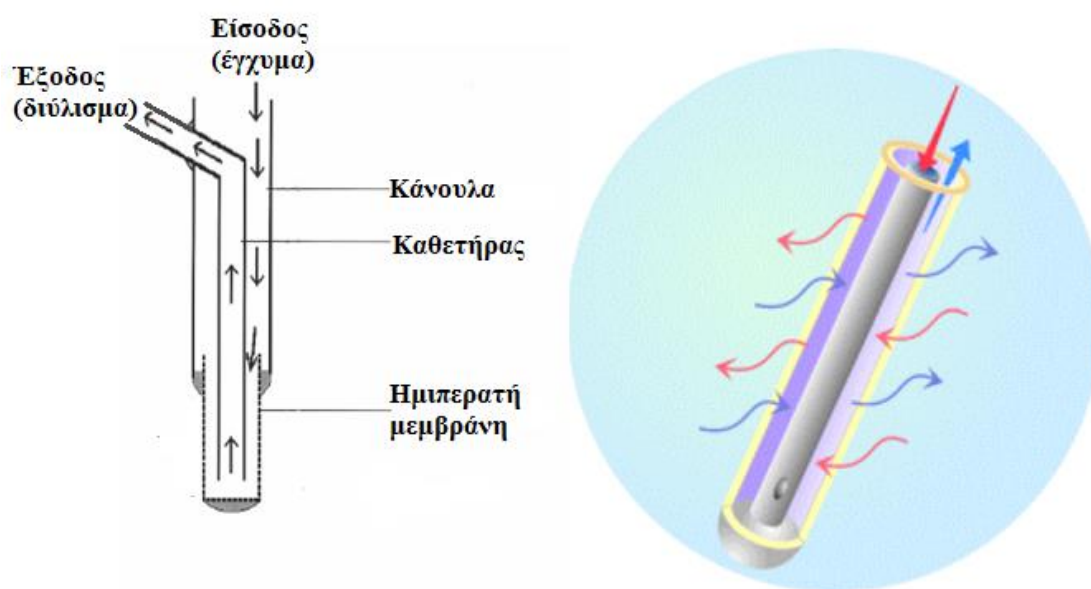
Η τεχνική της μικροδιάλυσης αποτελεί κατάλληλη μέθοδο για σχέδια μελέτης που αφορούν την τοπική εφαρμογή φαρμάκων και άλλων ουσιών στο δέρμα, με τη μορφή διαδερμικών επιθεμάτων, διαλυμάτων ή τοπικών σκευασμάτων και τη δειγματοληψία τους στο χόριο ή στον υποδόριο ιστό.<sup>112</sup> Ουσιαστικά, η μικροδιάλυση δίνει τόσο μια *in vitro* όσο και μια *in vivo* προεπισκόπηση της εκχύλισης ουσιών στον ιστό στόχο πριν δημιουργηθούν μεταβολές λόγω της συστηματικής κυκλοφορίας του αίματος.<sup>113</sup>

Η τεχνική της μικροδιάλυσης βασίζεται στην αργή εισαγωγή ενός διαλύματος (έγχυμα) μέσω ενός καθετήρα στον ιστό, και στη διάχυση των μορίων από τον ιστό στο έγχυμα. Το υγρό του καθετήρα μετά τη διάχυση των ουσιών (διάλυμα) συλλέγεται και στη συνέχεια αναλύεται με σκοπό τον καθορισμό της ταυτότητας και της συγκέντρωσης των μορίων που βρίσκονται στο εξωκυττάριο υγρό.<sup>113</sup>

Για την τεχνική της μικροδιάλυσης, είναι διαθέσιμοι διαφορετικοί τύποι καθετήρων κατασκευασμένοι συνήθως από εύθραυστο υλικό, με πιο συχνά χρησιμοποιούμενο τον κάθετο καθετήρα έναντι του γραμμικού.<sup>112</sup> Ο καθετήρας έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να μιμείται ένα τριχοειδές αγγείο.<sup>113</sup> Αποτελείται από μία εξωτερική ημιπερατή μεμβράνη, φτιαγμένη από κυτταρίνη, πολυακρυλονιτρίλιο ή πολυκαρβονικό αιθέρα, με μέγεθος πόρων εύρους 20.000-100.000 Da μέσω των οποίων διαχέονται μόρια



μεγέθους μικρότερου των πόρων της.<sup>114,115</sup> Το έγχυμα εισάγεται στον καθετήρα μέσω ενός εσωτερικού σωλήνα, ρέει προς το άκρο του, εξέρχεται από το σωλήνα και εισέρχεται στο χώρο μεταξύ του εσωτερικού σωλήνα και της εξωτερικής μεμβράνης. Η κατεύθυνση της ροής είναι τώρα αντίθετη και το υγρό κινείται προς το εγγύς άκρο του καθετήρα και σε αυτό το σημείο πραγματοποιείται η διάχυση των μορίων μεταξύ του εξωκυττάριου υγρού και του διαλύματος του καθετήρα (Εικόνα 22).<sup>113</sup> Με αυτό τον τρόπο, είτε ανακτάται η ουσία από το εξωκυττάριο υγρό ή παραδίδεται σε αυτό, ανάλογα με την κατεύθυνση της διάχυσης, η οποία ορίζεται από τη διαφορά της συγκέντρωσης στην επιφάνεια της μεμβράνης.<sup>115</sup> Η ανάκτηση της εξεταζόμενης ουσίας στο διάλυμα είναι αντιστρόφως ανάλογη της ροής του εγχύματος. Σε υπερβολικά χαμηλό ρυθμό ροής, π.χ. 0,1ml/min, μπορεί να επιτευχθεί 100% ανάκτηση.<sup>115</sup> Η ανάκτηση λοιπόν, εξαρτάται από το ρυθμό ροής του εγχύματος, το ρυθμό διάχυσης, την απόδοση του καθετήρα, την επιλογή της ημιπερατής μεμβράνης και τη θερμοκρασία.<sup>114</sup>



Εικόνα 22<sup>113</sup>: Διάχυση των μορίων μεταξύ του εξωκυττάριου υγρού και του διαλύματος του καθετήρα.

Οι καθετήρες εισάγονται χρησιμοποιώντας μία κάνουλα για οδηγό, η οποία εισάγεται οριζοντίως στο χόριο ή στον υποδόριο ιστό. Ο καθετήρας εισάγεται στη συνέχεια στην αντίθετη κατεύθυνση, μέσω της ανοιχτής άκρης της κάνουλας, και η τελευταία αποσύρεται με τον καθετήρα ακόμη στη θέση του.<sup>112</sup> Γενικά όταν ένας καθετήρας τοποθετείται σε έναν ιστό, ο ιστός τραυματίζεται και ενδεχομένως να επηρεάσει το

αποτέλεσμα, γι αυτό είναι απαραίτητη μια περίοδος εξισορρόπησης, συνήθως 60 λεπτών, πριν τη συλλογή του δείγματος.<sup>114</sup> Ως έγχυμα χρησιμοποιείται ένα φυσιολογικό διάλυμα αποτελούμενο από ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους, το λεγόμενο ισοτονικό διάλυμα σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που βρίσκονται στον εξωκυττάριο χώρο ώστε να μη δημιουργούνται διαφορετικές οσμωτικές πιέσεις εντός και εκτός της ημιπερατής μεμβράνης.<sup>114,115</sup>

Στην πραγματικότητα ο αριθμός των ενώσεων που μπορούν να παρακολουθούν στο δύλισμα, περιορίζεται μόνο από την ευαισθησία των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών μεθόδων, με την HPLC ως την πλέον διαδεδομένη αναλυτική τεχνική.<sup>113</sup>

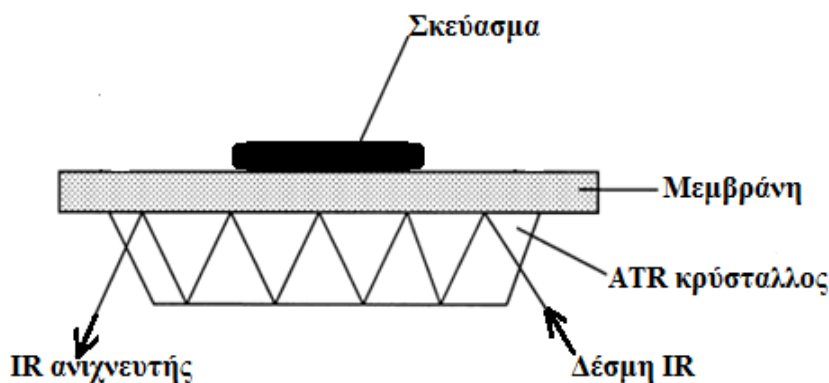
Ενώ η μέθοδος είναι σχετικά φθηνή, παρέχει αναπαραγωγιμότητα και την ικανότητα χρήσης της σε ασθενές δέρμα, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Ο κυριότερος περιορισμός της είναι η αδυναμία δειγματοληψίας ενώσεων με πολύ υψηλή λιποφιλία και αργή διείσδυση. Επιπλέον, η μέθοδος είναι ακατάλληλη για ουσίες που παρουσιάζουν *in vitro* ανάκτηση μικρότερη από 4 %, λόγω της μη αναμενόμενης *in vitro* ανάκτησης, και ουσίες που εμφανίζουν αργή διείσδυση, εξαιτίας της μικρής διάρκειας του πειράματος.<sup>112</sup>

### **3.2.4 Τεχνική ATR-FTIR**

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται ευρέως για ποικίλες *in vitro* και *in vivo* εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων τη μέτρηση της διαπερατότητας χημικών ουσιών η οποία βασίζεται στην ακτινοβολία υπέρυθρου (IR) και στην φασματοσκοπία Raman.<sup>116</sup> Η υπέρυθη φασματοσκοπία χρησιμοποιείται κυρίως σε συνδυασμό με το μετασχηματισμό Fourier γεγονός που βελτίωσε δραματικά την απόκτηση των φασμάτων με σχετικά λιγότερο θόρυβο, αυξημένη ευαισθησία και βελτιωμένη ανάλυση.<sup>117</sup> Σήμερα, η τεχνική FTIR-ATR είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική φασματοσκοπίας για τη μελέτη της κινητικής της διαπερατότητας. Ουσιαστικά, με αυτή την τεχνική υπολογίζεται η συγκέντρωση της ουσίας που έχει διαπεράσει τη μεμβράνη δεδομένου ότι η ένταση της IR απορρόφησης των χημικών ομάδων που βρίσκονται σε ένα μόριο είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του.<sup>116</sup> Περαιτέρω, η μέθοδος ATR-IR μπορεί επίσης να μετρήσει άλλα συστατικά του συστήματος χορήγησης (συνδιαλύτες, ενισχυτές διαπερατότητας κλπ), μαζί με αλλαγές των λιπιδίων στην κεράτινη στιβάδα και απορροφήσεις των

πρωτεϊνών που προκαλούνται από την εφαρμογή του συστήματος παροχής του φαρμάκου.<sup>118</sup>

Η τεχνική ATR-FTIR είναι αρκετά απλή (Εικόνα 23). Το σύστημα της υπό μελέτη ουσίας τοποθετείται σε μία μεμβράνη, συνήθως δέρμα ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης, η οποία βρίσκεται σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του διαφανούς κρυστάλλου ZnSe.<sup>109,117</sup> Ο κρύσταλλος είναι τοποθετημένος σε ένα φασματομέτρο το οποίο συνδέεται σε υπολογιστή εφοδιασμένο με το κατάλληλο λογισμικό και πραγματοποιείται λήψη φασμάτων FTIR από την διεπαφή του κρυστάλλου και της μεμβράνης για μία χρονική περίοδο. Κατά τη διάρκεια της διέλευσης μέσα από το κρύσταλλο, η δέσμη IR διαπερνά την μεμβράνη και η διεισδυτική ουσία απορροφά την εκπεμπόμενη ακτινοβολία σε συγκεκριμένες συχνότητες που αντιστοιχούν στο φάσμα απορρόφησης της. Τα δεδομένα που λαμβάνονται είναι το προφίλ συγκέντρωσης-χρόνου της υπό εξέταση ουσίας στη διεπιφάνεια κρυστάλλου-μεμβράνης.<sup>117</sup>



Εικόνα 23<sup>109</sup>: Αναπαράσταση της μεθόδου ATR-FTIR.

Η τεχνική ATR-FTIR μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπό την προϋπόθεση ότι προσδιορίζεται μια μοναδική απορρόφηση IR, διαφορετική από τις απορροφήσεις των συστατικών της κεράτινης στιβάδας. Ενώ η κεράτινη στιβάδα απορροφά εκτενώς ακτινοβολία στο μέσο της IR περιοχής, υπάρχουν «παράθυρα» κυρίως μεταξύ 1700-2500  $\text{cm}^{-1}$  και πέρα των 3.600  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>118</sup> Το βάθος της διείσδυσης της δέσμης IR εντός της κεράτινης στιβάδας εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, όπως το υλικό του ATR κρυστάλλου, ο δείκτης διάθλασης του δέρματος, η γωνία πρόσπτωσης της δέσμης και το μήκος κύματος.<sup>116</sup> Η IR δέσμη είναι της τάξης του 2-3  $\mu\text{m}$  και, ως εκ τούτου, ανιχνεύεται μόνο η περιοχή της διεπιφάνειας μεμβράνης-κρυστάλλου.

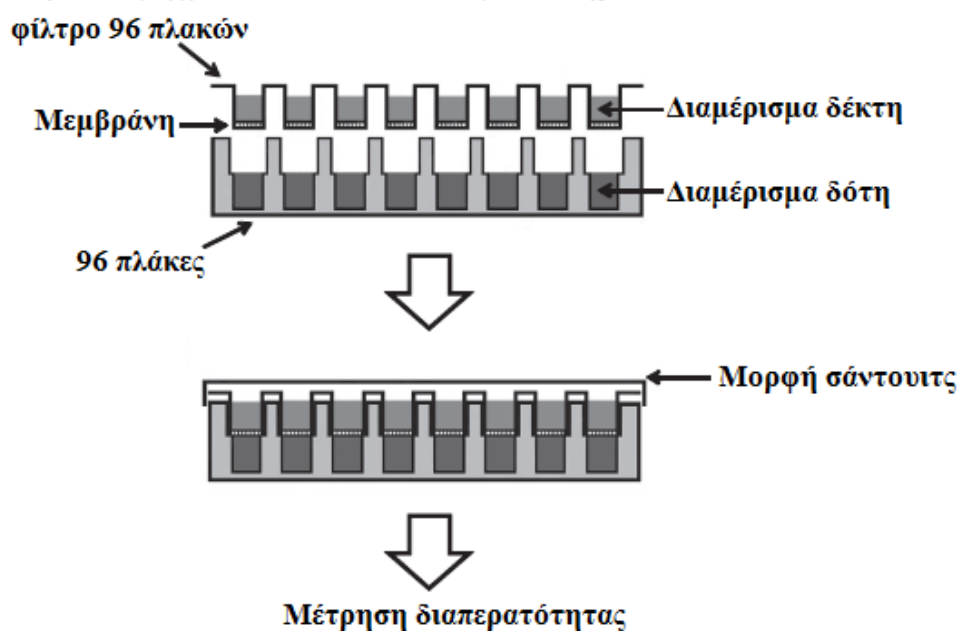
Δεδομένου ότι ένα τυπικό στρώμα κερατινοκυττάρων έχει πάχος 0.2-1.5  $\mu\text{m}$ , η IR δέσμη φτάνει μόνο τις πρώτες πέντε στρώσεις κερατινοκυττάρων της κεράτινης.<sup>116,117</sup>

Αν και η αναλυτική τεχνική ATR-FTIR είναι γρήγορη, μη επεμβατική, και παρέχει στοιχεία για τη διέλευση ουσιών μέσω του δέρματος σε πραγματικό χρόνο, με την πραγματοποίησή ενός μόνο πειράματος, περιορίζεται από το γεγονός ότι η διαπεραστική ουσία πρέπει να απορροφά στην περιοχή του IR (π.χ., ενώσεις που περιέχουν κυανο- και αζιδο-ομάδες ή δευτεριωμένες ενώσεις).<sup>109,117</sup>

### **3.2.5 Μέθοδος PAMPA**

Η δοκιμασία διαπεράσεως παράλληλης τεχνητής μεμβράνης ή αλλιώς μέθοδος PAMPA, η οποία δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά το 1988<sup>119</sup>, είναι μια τεχνική που αναπτύχθηκε για την έγκαιρη αξιολόγηση της παθητικής διαπερατότητας. Συνήθως χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της γαστρεντερικής απορρόφησης, και της διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, ενώ πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει την προσαρμογή αυτής της δοκιμασίας για το δέρμα.<sup>119,120</sup>

Η μέθοδος PAMPA (Εικόνα24) περιλαμβάνει 96-πλάκες και η κάθε μία από αυτές διαθέτει ένα υδρόφοβο φίλτρο το οποίο διαχωρίζει δύο διαμερίσματα, τον δότη και τον δέκτη.<sup>120,121</sup> Το φίλτρο είναι επιστρωμένο με τεχνητή μεμβράνη ή με δέρμα ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης.<sup>122</sup> Το διαμέρισμα του δότη τυπικά περιέχει το σκεύασμα της υπό εξέταση ουσίας, ενώ το διαμέρισμα δέκτη περιέχει το διάλυμα του υποδοχέα (συνήθως ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,4).<sup>120,121</sup> Σε κάθε πλάκα τοποθετούνται μαγνητικοί αναδευτήρες για την επίτευξη ομοιόμορφης κατανομής της ουσίας.<sup>122</sup> Το διαμέρισμα του υποδοχέα σκεπάζει το διαμέρισμα του δότη, δημιουργώντας μια μορφή σάντουιτς, και η ουσία μεταφέρεται αυτόματα από το δότη στο δέκτη. Μετά από καθορισμένο χρόνο, το PAMPA σάντουιτς αφαιρείται από την ανάδευση και μετράται η συγκέντρωση της ουσίας στα δύο διαμερίσματα με τη βοήθεια αναλυτικών τεχνικών όπως UV-Vis ή υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με MS.<sup>123</sup>



Εικόνα 24<sup>120</sup>: Αναπαράσταση μεθόδου PAMPA.

Ένας από τους κύριους περιορισμούς των μοντέλων PAMPA είναι η υποεκτίμηση της απορρόφησης ενώσεων που απορροφούνται ενεργά μέσω μεταφορών.<sup>123</sup>

Παρά τον περιορισμό, η μέθοδος PAMPA μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη μιας γρήγορης, οικονομικής, αποδοτικής, αυτόματης, υψηλής τεχνολογίας πλατφόρμας προσδιορισμού της παθητικής μεταφοράς.<sup>120,122</sup> Αν και η μέθοδος απαιτεί λιγότερη εντατική εργασία από ότι η χρήση κυττάρων διάχυσης Franz, φαίνεται να εμφανίζουν παρόμοια προβλεψιμότητα.<sup>123</sup>

### 3.2.6 USP μέθοδοι

Ο έλεγχος της αποδέσμευσης in vitro είναι πλέον απαραίτητος και εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό και την αξιολόγηση των επιθυμητών χαρακτηριστικών των διαδερμικών συστημάτων. Μερικά από αυτά τα χαρακτηριστικά είναι ο ρυθμός αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας από το έμπλαστρο, η επαναληψιμότητα και η αξιοπιστία του ρυθμού αποδέσμευσης και ο έλεγχος της σταθερότητας του συστήματος.<sup>124</sup> Οι δοκιμές απόδοσης του προϊόντος πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της έρευνας και ανάπτυξης, του ποιοτικού ελέγχου, της επίδειξης της ομοιότητας των προϊόντων ή της απόδειξης της συμμόρφωσης με τις κατευθυντήριες γραμμές του FDA.<sup>125</sup> Η Αμερικάνικη φαρμακοποιία (USP-

United States Pharmacopeia) και αρκετές άλλες φαρμακοποιίες έχουν υιοθετήσει μεθόδους για τον *in vitro* προσδιορισμό της απελευθέρωσης φαρμάκων από διαδερμικά συστήματα. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν τη συσκευή V (περιστρεφόμενου πτερυγίου με δίσκο), τη συσκευή VI (περιστρεφόμενου κυλίνδρου), και τη συσκευή VII (παλινδρομικού δίσκου), οι οποίες αντιπροσωπεύουν τροποποιήσεις της πρότυπης μεθόδου διάλυσης από του στόματος χορηγούμενων φαρμακοτεχνικών μορφών. Οι διαδικασίες αυτές δεν εφαρμόζονται στα τοπικά σκευάσματα, όπως κρέμες και αλοιφές, καθώς είναι αδύνατη η τοποθέτησή της σε μία συσκευή διάλυσης.<sup>89</sup>

Σε κάθε πείραμα πρέπει να καθορίζεται<sup>45</sup>:

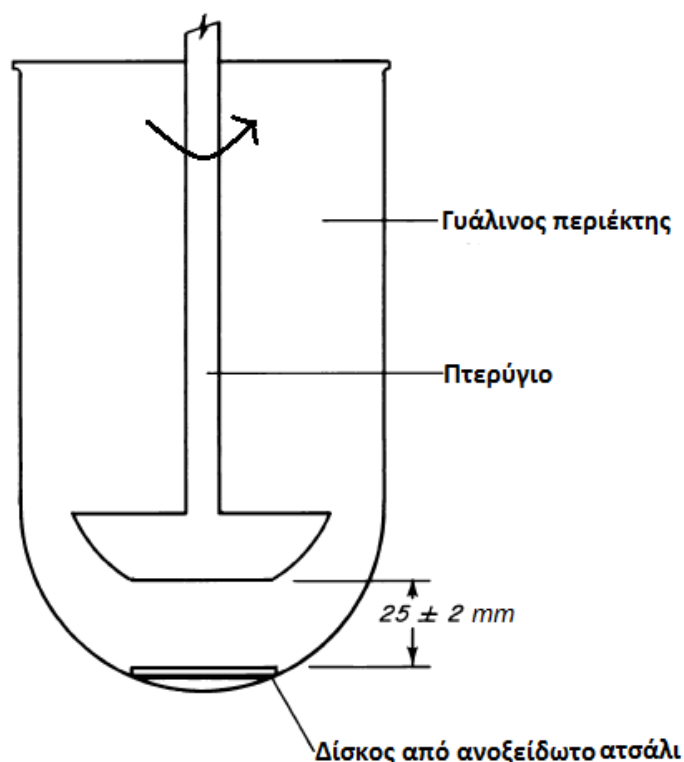
- Η σύσταση, η θερμοκρασία και ο όγκος του μέσου διάλυσης.
- Η ταχύτητα περιστροφής.
- Ο χρόνος και ο τρόπος δειγματοληψίας και η μέθοδος ανάλυσης των δειγμάτων.

Τα πειραματικά αποτελέσματα αποδίδονται υπό μορφή διαγράμματος όπου απεικονίζεται η ποσότητα του φαρμάκου που αποδεσμεύεται στο μέσο διάλυσης σε συνάρτηση με το χρόνο.<sup>124</sup>

### **3.2.6.1 Συσκευή περιστρεφόμενου πτερυγίου με δίσκο (USP apparatus V)**

Η μέθοδος περιστρεφόμενου πτερυγίου με δίσκο (Εικόνα 25) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της απελευθέρωσης του φαρμάκου από παρασκευασμένα επιθέματα. Επιθέματα γνωστού πάχους κόβονται σε καθορισμένο σχήμα, ζυγίζονται, και τοποθετούνται σε δίσκο από ανοξείδωτο ατσάλι. Ο δίσκος στη συνέχεια τοποθετείται σε γυάλινο ποτήρι σε απόσταση 2,5 cm από το περιστρεφόμενο πτερύγιο.<sup>126</sup> Ο δίσκος είναι σχεδιασμένος για να συγκρατεί το σύστημα επίπεδο και είναι τοποθετημένος έτσι ώστε η επιφάνεια απελευθέρωσης να είναι παράλληλη με το κάτω μέρος της λεπίδας του πτερυγίου.<sup>125</sup> Το περιστρεφόμενο πτερύγιο αποτελείται από μία μεταλλική ράβδο στο άκρο της οποίας προσαρμόζεται ένα πτερύγιο καθορισμένων διαστάσεων το οποίο λειτουργεί σε ταχύτητα 50-150 rpm (στροφές ανά λεπτό).<sup>124,126</sup> Το ποτήρι είναι κυλινδρικού σχήματος με σφαιρικό πυθμένα χωρητικότητας 500, 900 ή 1000 ml, και μπορεί να καλυφθεί κατά τη

διάρκεια της δοκιμής για να ελαχιστοποιηθεί η εξάτμιση.<sup>45,124,125</sup> Το μέσο διάλυσης, συνήθως ρυθμιστικό διάλυμα, πχ. διάλυμα φωσφορικού άλατος pH 7.4, θερμοστατείται στους  $32 \pm 0,5$  °C. Σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα, μέχρι και 24 ώρες, λαμβάνονται δείγματα τα οποία αναλύονται με UV φασματοφωτόμετρο ή HPLC. Για καλύτερα αποτελέσματα, το πείραμα πραγματοποιείται σε τριπλέτες και υπολογίζεται η μέση τιμή.<sup>126</sup>



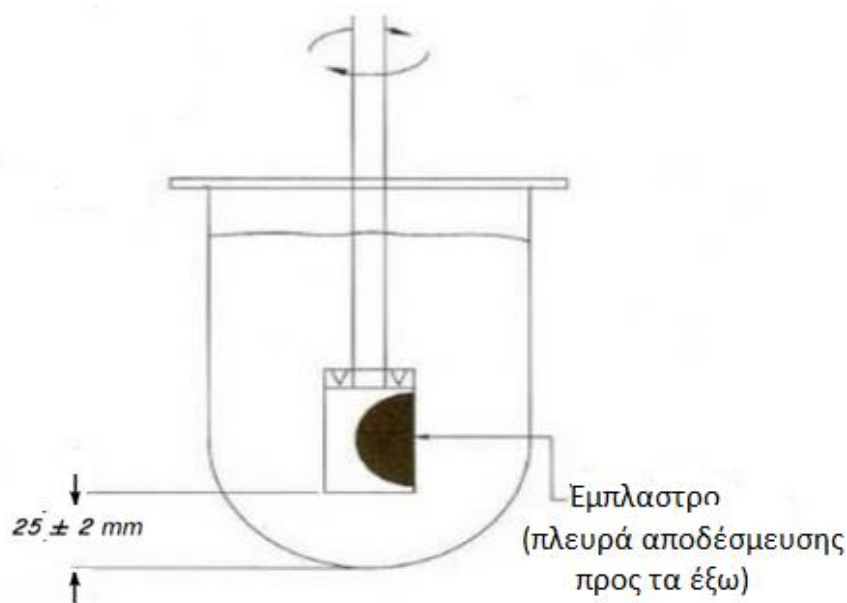
Εικόνα 25<sup>127</sup>: Συσκευή περιστρεφόμενου πτερυγίου με δίσκο (USP apparatus V).

Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η απλότητά της, καθώς η οργανολογία της είναι ίδια με αυτή της συσκευής II με την μόνη προσθήκη του ατσάλινου δίσκου, και μπορεί να εφαρμοστεί στα περισσότερα διαδερμικά συστήματα χορήγησης.<sup>125,127</sup>

### 3.2.6.2 Συσκευή περιστρεφόμενου κυλίνδρου (USP apparatus VI)

Η συσκευή περιστρεφόμενου κυλίνδρου είναι παρόμοια με τη συσκευή I, με τη μόνη διαφορά ότι η μεταλλική ράβδος έχει στο άκρο της έναν κύλινδρο από ανοξείδωτο ατσάλι αντί για καλαθίσκο (Εικόνα 26). Ο περιστρεφόμενος κύλινδρος εισάγεται σε ποτήρι που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα, του οποίου η θερμοκρασία διατηρείται στους  $32 \pm 0,5$  °C με τη βοήθεια υδατόλουτρου.<sup>125</sup> Στην αρχή κάθε πειράματος, το έμπλαστρο τοποθετείται σε ένα κομμάτι cyprophan, πορώδες υλικό από κυτταρίνη,

και το σύστημα αυτό προσκολλάται στον κύλινδρο, με την πλευρά αποδέσμευσης του φαρμάκου προς το μέσο διάλυσης.<sup>125,128</sup> Η απόσταση μεταξύ του εσωτερικού πυθμένα του ποτηριού και του κυλίνδρου διατηρείται στα  $25 \pm 2$  mm. Σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, λαμβάνονται δείγματα από τη ζώνη της επιφανείας του μέσου διάλυσης και της κορυφής του κυλίνδρου.<sup>125</sup>



Εικόνα 26<sup>129</sup>: Συσκευή περιστρεφόμενου κυλίνδρου (USP apparatus VI).

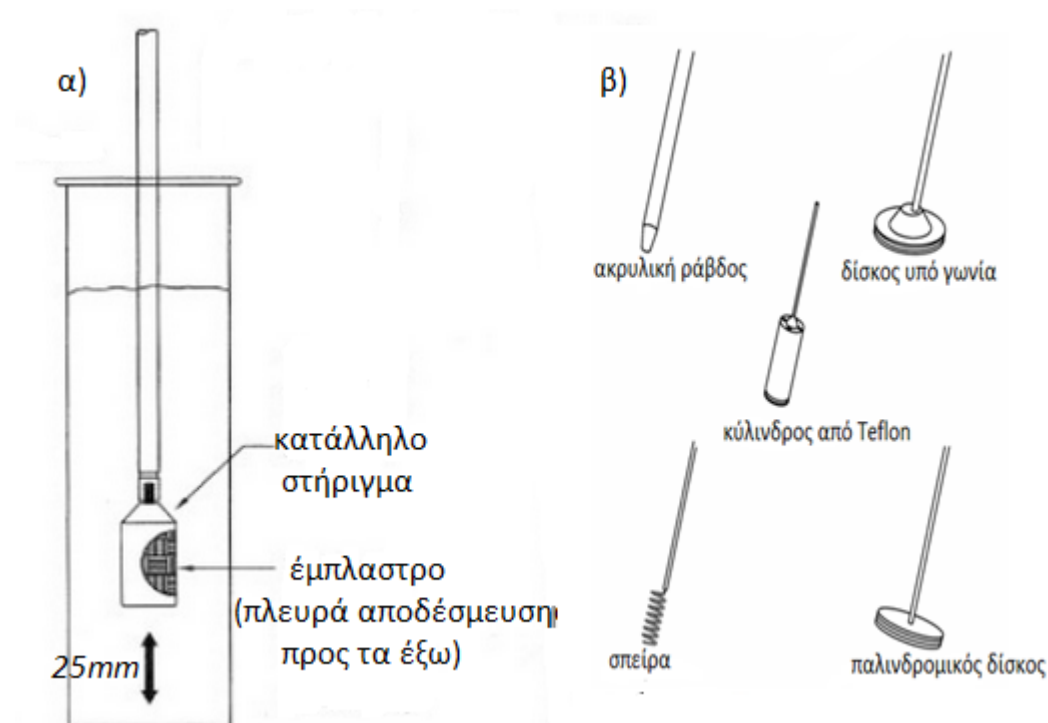
Ο κυριότερος περιορισμός της μεθόδου είναι ότι τα επιθέματα δεν μπορούν να κοπούν σε μικρότερα μεγέθη.<sup>128</sup>

### 3.2.6.3 Συσκευή παλινδρομικού στηρίγματος (USP apparatus VII)

Η συσκευή αποτελείται από ένα σύνολο ογκομετρικά βαθμονομημένων δοχείων, από γυαλί ή άλλο αδρανές υλικό, έναν κινητήρα, ένα συγκρότημα μετάδοσης κίνησης που παλινδρομεί το σύστημα κάθετα με ταχύτητα 30 rpm και ένα σετ στηριγμάτων του δείγματος (Εικόνα 27).<sup>128,130</sup> Τα δοχεία, κυλινδρικού σχήματος με επίπεδο πυθμένα, περιέχουν 50-200 ml μέσο διάλυσης και βυθίζονται μερικώς σε κατάλληλο υδατόλουτρο που επιτρέπει τη διατήρηση της θερμοκρασίας μέσα στα δοχεία στους  $32 \pm 0,5$  °C.<sup>128</sup> Αρχικά, το έμπλαστρο τοποθετείται σε ένα κομμάτι cuprophan και το σύστημα συνδέεται, στη συνέχεια, σε κατάλληλο στήριγμα με τη βοήθεια δακτυλίων.<sup>125</sup> Εναλλακτικά, το διαδερμικό σύστημα τοποθετείται απευθείας στο στήριγμα χρησιμοποιώντας ειδική κόλλα.<sup>125,129</sup> Κανένα τμήμα της συσκευής, συμπεριλαμβανομένου του περιβάλλοντος που είναι τοποθετημένη, δεν πρέπει να



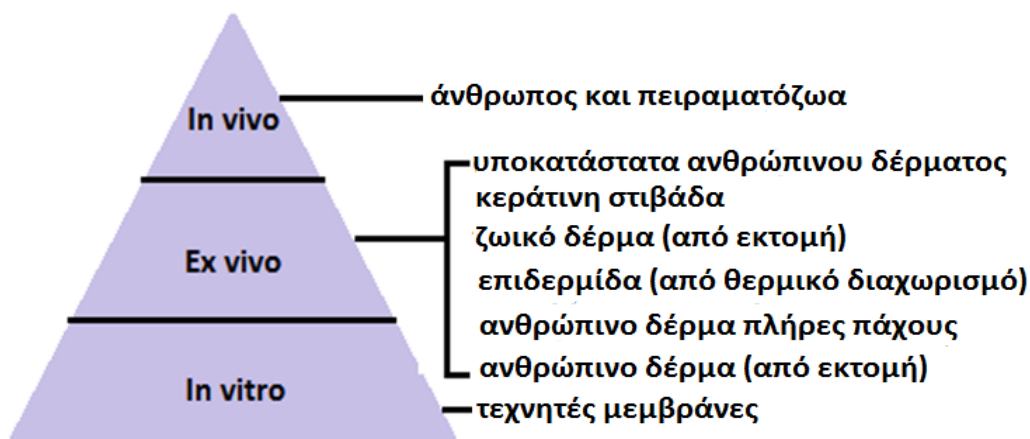
συμβάλει στην ομαλή, κάθετη, παλινδρομική κίνηση του στηρίγματος του δείγματος.<sup>125</sup>



Εικόνα 27<sup>129</sup>: α) Συσκευή παλινδρομικού στηρίγματος (USP apparatus VII), και β) Σύνολο χρησιμοποιούμενων στηριγμάτων.

### 3.3 Μεμβράνη επιλογής

Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των διαδερμικών συστημάτων, κρίνεται εξαιρετικά σημαντική η επιλογή των *in vitro* μοντέλων για την πρόβλεψη της διαπερατότητας.<sup>131</sup> Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα μεμβρανών για τη μελέτη της διάχυσης μέσω του δέρματος είναι οι τεχνητές μεμβράνες και το δέρμα ζωικής ή ανθρώπινης προέλευσης (Εικόνα 28).<sup>92</sup> Στην ιδανική περίπτωση, οι ερευνητές επιλέγουν ανθρώπινο δέρμα για την αξιολόγηση της διείσδυσης των υποψηφίων φαρμάκων παρότι τα δείγματα ανθρώπινου δέρματος, επαρκούς μεγέθους και ποιότητας, δεν είναι εύκολα διαθέσιμα.<sup>131</sup> Η επιλογή ζωικού δέρματος είναι μια εναλλακτική λύση που ωστόσο εμφανίζει αρκετούς περιορισμούς. Οι περιορισμοί αυτοί οδήγησαν τους επιστήμονες να αναπτύξουν διάφορες συνθετικές μεμβράνες για να ξεπεραστούν τυχόν προβλήματα.<sup>132</sup>



Σχήμα 8<sup>92</sup>: Χρησιμοποιούμενα μοντέλα μεμβρανών για τη μελέτη της διαδερμικής απορρόφησης δραστικών φαρμακευτικών συστατικών.

### 3.3.1 Μεμβράνη ανθρώπινου δέρματος

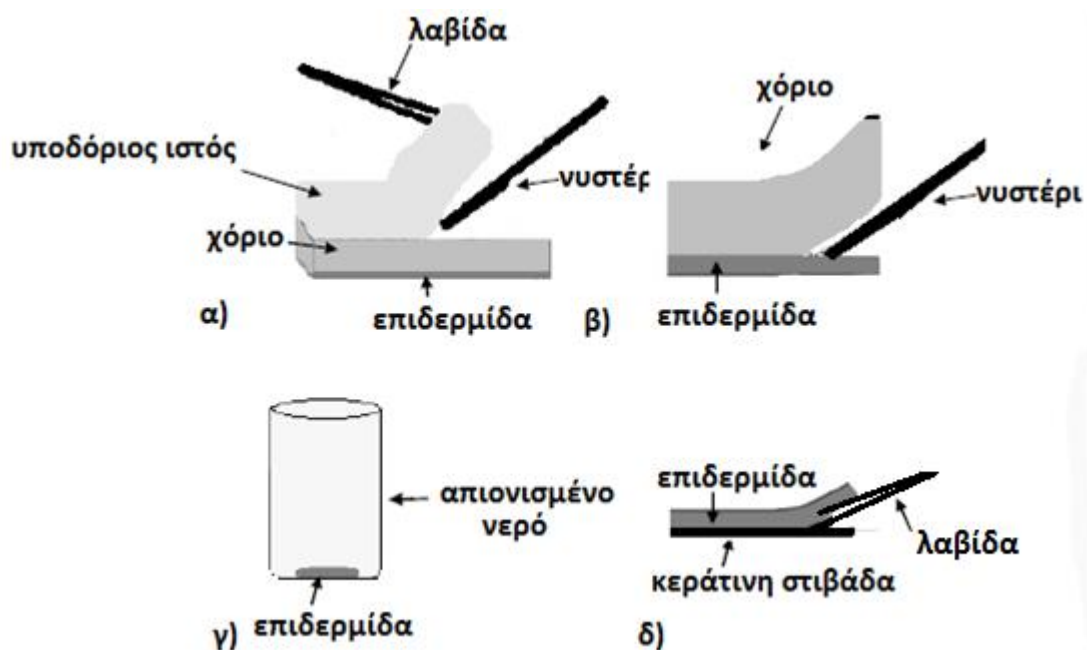
Στην πλειονότητα, για τις περισσότερες in vitro μελέτες διαδερμικής απορρόφησης επιλέγεται ex vivo ανθρώπινο δέρμα, εξαιτίας της καλύτερης in vitro - in vivo συσχέτισης που προσφέρει. Συνήθως χρησιμοποιείται δέρμα από πλάτη, κοιλιακή χώρα ή μηρούς, λόγω της μεγαλύτερης διαθέσιμης επιφάνειας, προερχόμενο από αυτοψίες, μειωτικές πλαστικές επεμβάσεις ή πτώματα, το οποίο απομονώνεται με τη διαδικασία της χειρουργικής εκτομής.<sup>6,133</sup>

Η εγκυρότητα της χρήσης δέρματος από εκτομή εξαρτάται από τρεις υποθέσεις<sup>30</sup>:

- Καμία διαδικασία που πραγματοποιείται σε ζωντανό δέρμα δεν επηρεάζει τη μη διαπερατότητα του. Για ενώσεις οι οποίες ακολουθούν αυστηρά το νόμο διάχυσης του Fick, η υπόθεση αυτή είναι έγκυρη. Μια αξιοσημείωτη εξαίρεση είναι τα φάρμακα που μεταβολίζονται από τα ένζυμα της βιώσιμης επιδερμίδας.
- Το χόριο δεν επηρεάζει τη διείσδυση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της απορρόφησης, οι ενώσεις μπορεί να προσδεθούν στο χόριο.
- Οι συνθήκες της επιφάνειας του είναι παρόμοιες με εκείνες του ζωντανού δέρματος.

Τα πειράματα μπορούν να εκτελεστούν με τρεις διαφορετικούς τύπους δέρματος όπως δέρμα πλήρους πάχους (full thickness skin-FTS), επιδερμίδα και κεράτινη στιβάδα.<sup>134</sup>

Το ανθρώπινο δέρμα πλήρες πάχους αποτελείται από κεράτινη στιβάδα, βιώσιμη επιδερμίδα και χόριο (πάχους 2000-3000  $\mu\text{m}$ ).<sup>92</sup> Το δέρμα τοποθετείται σε απορροφητικό χαρτί ώστε να μη γλιστράει και, στη συνέχεια, το υποδόριο λίπος αφαιρείται από το κάτω μέρος του χορίου με τη βοήθεια νυστεριού (Εικόνα 29<sup>α</sup>). Αν και η χρήση δέρματος πλήρους πάχους είναι ευκολότερη αφού απαιτείται λιγότερη προετοιμασία, η παρουσία του χορίου μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα.<sup>134</sup> In vivo, το διαχεόμενο μόριο δεν μπορεί να διασχίσει το χόριο σε όλες τις περιπτώσεις. Τα αγγεία στο δερμοεπιδερμικό συνδέσμο μπορούν γρήγορα να σταματήσουν το μόριο από το να φτάσει σε αυτή τη στιβάδα.<sup>92</sup> Επιπλέον, οι μεγάλοι χρόνοι υστέρησης των υδρόφιλων ουσιών καθώς και ο δυσμενής μερισμός των λιπόφιλων ενώσεων στις βιώσιμες στιβάδες, απαιτεί, ορισμένες φορές, περαιτέρω διαχωρισμό του δέρματος σε μεμονωμένα στρώματα και, ως εκ τούτου, είναι καλύτερο να διεξάγονται ex vivo πειράματα, για ορισμένα μόρια, χωρίς το χόριο. Γενικά, η μείωση του πάχους της μεμβράνης μειώνει το χρόνο διεξαγωγής των πειραμάτων και ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος βακτηριακής μόλυνσης.<sup>6</sup>



Εικόνα 29<sup>92</sup>: Απομάκρυνση στιβάδων από δέρμα πλήρες πάχους με την τεχνική του θερμικού διαχωρισμού.

Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, χρησιμοποιείται συχνά δέρμα που έχει προκύψει με την τεχνική της δερμοτομής και αποτελείται από την κεράτινη στιβάδα και τη βιώσιμη επιδερμίδα. Η πλήρης απομάκρυνση του χορίου μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μηχανικές, θερμικές και χημικές τεχνικές. Αν και έχει αναφερθεί η χρήση αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος, βρωμιούχου νατρίου και αμμωνίας, υπάρχουν υπόνοιες ότι τα ισχυρά οξέα ή βάσεις μπορεί να αλλάξουν τη ρυθμιστική ικανότητα του δέρματος και, συνεπώς, τη διείσδυση των ιονισμένων φαρμάκων.<sup>6</sup> Συνηθέστερα, ο διαχωρισμός του χορίου από την επιδερμίδα επιτυγχάνεται με τη χρήση θερμικού διαχωρισμού που βασίζεται στην τεχνική Kligman (Εικόνα 29 α-γ).<sup>135</sup> Αρχικά, αφαιρείται το υποδόριο λίπος και το μεγαλύτερο τμήμα του χορίου με τη χρήση νυστεριού και λαβίδας. Στη συνέχεια το δέρμα εμβαπτίζεται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει απιονισμένο νερό, 60°C, για 1-2 λεπτά.<sup>134,136</sup> Τέλος, με μία σπάτουλα ή τη λαβίδα, απομακρύνονται τυχόν εναπομένοντα τμήματα του χορίου ή του δερμοεπιδερμικού συνδέσμου.<sup>134</sup> Η επιδερμίδα που προκύπτει από το θερμικό διαχωρισμό έχει πάχος περίπου 20-200 μm και αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα.<sup>88,92</sup>

Σε ορισμένες περιπτώσεις, για την πειραματική εργασία απαιτείται μόνο η κεράτινη στιβάδα (10-15 μm). Το κερατινοποιημένο στρώμα μπορεί να απομονωθεί με πλήρη βύθιση της επιδερμίδας που έχει προκύψει με θερμικό διαχωρισμό σε 2% διάλυμα θρυψίνης για 24 h, με σκοπό την πέψη του επιδερμικού ιστού, ή με προσεκτική απομάκρυνση των υποκείμενων στιβάδων της κατεργασμένης επιδερμίδας με ειδική λαβίδα (Εικόνα 29 α-δ).<sup>92,134</sup>

Δυστυχώς, υπάρχουν ορισμένα μειονεκτήματα στα μοντέλα ανθρώπινου δέρματος, με σημαντικότερο την υψηλή μεταβλητότητα, με αποτέλεσμα την αναζήτηση υποκατάστατων του. Πιο συγκεκριμένα, το νεκρό ανθρώπινο δέρμα μπορεί να δείξει υψηλή ενδοατομική και διατομική μεταβλητότητα, σε ποσοστό 22%-37% και 50%, αντίστοιχα.<sup>137</sup> Ο ρυθμός διάχυσης διαμέσου του ανθρώπινου δέρματος εξαρτάται από την ανατομική περιοχή από την οποία έχει αφαιρεθεί το δέρμα και επηρεάζεται από την ηλικία, τη φυλή και το φύλο του δότη.<sup>138</sup> Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η διακύμανση στη λειτουργία φραγμού του δέρματος μεταξύ ατόμων και μεταξύ ανατομικών θέσεων έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 2 έως 6 φορές, ανάλογα με τη μέθοδο μέτρησης.<sup>139</sup> Πρόσθετα μειονεκτήματα είναι η μειωμένη διαθεσιμότητα του, οι ειδικές απαιτήσεις αποθήκευσης, η χρονοβόρα προετοιμασία του και η

λεπτότητα κατά το χειρισμό του και το γεγονός ότι τα δείγματα θεωρούνται βιολογικού κινδύνου και, ως εκ τούτου, απαιτούν ιδιαίτερη μεταχείριση.<sup>132,138</sup>

Στο μέλλον, τα ανθρώπινα ισοδύναμα δέρματος μπορούν να αίρουν αυτούς τους περιορισμούς. Τα ανθρώπινα υποκατάστατα δέρματος (HSS), το ανθρώπινο δέρμα βιομηχανικής προέλευσης (HBS), τα καλλιεργημένα υποκατάστατα δέρματος (CSS), τα ζωντανά ισοδύναμα δέρματος (LSE) και η ανακατασκευασμένη ανθρώπινη επιδερμίδα (RHE) παρέχουν μια νέα προοπτική στον τομέα των μελετών διαδερμικής απορρόφησης.<sup>92</sup>

### 3.3.2 Μεμβράνη ζωικού δέρματος

Η χρήση διαφόρων ζωικών δερμάτων είναι μια κοινώς αποδεκτή εναλλακτική λύση για τις *in vitro* μελέτες διαδερμικής διείσδυσης.<sup>91</sup> Οι μέθοδοι διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται για το ανθρώπινο δέρμα μπορούν εξίσου να εφαρμοστούν σε ζωικές μεμβράνες, με επιφυλάξεις και τροποποιήσεις όπου είναι απαραίτητο.<sup>140</sup>

Από τα διάφορα μοντέλα ζωικού δέρματος που χρησιμοποιούνται σήμερα για τις *ex vivo* μελέτες διαδερμικής διάχυσης, το δέρμα του χοίρου, ιδιαίτερα από το αυτί, θεωρείται πλησιέστερο προς το ανθρώπινο δέρμα και παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με αυτό.<sup>137</sup> Μελέτες έχουν δείξει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ *in vivo* πειραμάτων σε ανθρώπινο δέρμα και *ex vivo* πειραμάτων σε απομονωμένο δέρμα χοίρου. Επιπλέον, η ιστολογία και οι διαστάσεις του δέρματος του χοίρου είναι παρόμοιες με την ιστολογία και τις διαστάσεις του ανθρώπινου δέρματος (Πίνακας 2).<sup>94</sup> Παρόμοιες προβλέψεις με αυτές του ανθρώπινου δέρματος προσφέρει, επίσης, και το δέρμα των πιθήκων. Ωστόσο, τα μεγάλα ζώα είναι λιγότερο διαθέσιμα και πιο ακριβά από τα μικρότερα ζώα εργαστηρίου.<sup>92</sup>

Επιπλέον, το δέρμα των τρωκτικών χρησιμοποιείται συχνά ως *in vitro* μεμβράνη, πιθανώς λόγω της ευρύτερης χρήσης των ειδών αυτών στη φαρμακολογική έρευνα.<sup>91</sup>

Λόγω της έλλειψης γούνας, ορισμένοι ερευνητές πρότειναν τη χρήση άτριχων αρουραίων, ινδικών χοιριδίων και ποντικών πριν από αρκετά χρόνια. Η έλλειψη γούνας είναι ένα σημαντικό σημείο, δεδομένου ότι έχει αποκαλυφθεί ότι ο αριθμός των τριχικών θυλακίων, η διάμετρός τους και ο όγκος τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διείσδυση των ουσιών.<sup>92</sup> Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι το δέρμα των τρωκτικών δείχνει γενικά υψηλότερα ποσοστά διείσδυσης από το ανθρώπινο δέρμα λόγω της λεπτότερης κεράτινης στιβάδας των πρώτων, οδηγώντας συχνά σε εσφαλμένα συμπεράσματα (Πίνακας 2).<sup>141</sup>

Άλλα δέρματα ζώων που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μη τακτική βάση περιλαμβάνουν δέρμα φιδιού, βατράχου, χάμστερ, κατσίκας, γάτας, σκύλου, άλογου και χιμπατζή.<sup>140</sup>

Είδος	SC ( $\mu\text{m}$ )	Επιδερμίδα ( $\mu\text{m}$ )	Πλήρες δέρμα ( $\mu\text{m}$ )
Ανθρώπος	$16.8 \pm 0.7$	$46.9 \pm 2.3$	$2.97 \pm 0.28$
Χοίρος	$26.4 \pm 0.4$	$65.8 \pm 1.8$	$3.43 \pm 0.05$
Ποντίκι	$5.8 \pm 0.3$	$12.6 \pm 0.8$	$0.84 \pm 0.02$

Πίνακας 2<sup>94</sup>: Πάχος στιβάδων δέρματος σε διάφορα είδη οργανισμών.

Σε γενικές γραμμές, τα *in vitro* δεδομένα συμφωνούν στενά με τις *in vivo* παρατηρήσεις στο ότι τα περισσότερα δέρματα ζώων παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαπερατότητα από το ανθρώπινο δέρμα με αποτέλεσμα χαμηλές *in vitro-in vivo* συσχετίσεις.<sup>141,142</sup> Η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων οφείλεται στις διαφορές μεταξύ των ζωικών μοντέλων και του ανθρώπινου δέρματος όπως το πάχος και η σύνθεση της κεράτινης στιβάδας, η πυκνότητα των τριχικών θυλάκιων και των ιδρωτοποιών αδένων και η περιεκτικότητα σε νερό.<sup>143</sup> Έχει αποδειχθεί ότι η περιεκτικότητα του δέρματος σε λιπίδια είναι καθοριστικός παράγοντας της δυναμικής του φραγμού του και ότι οι διαφορές μεταξύ των ειδών ή μεταξύ των ανατομικών περιοχών οφείλονται στη μεταβαλλόμενη σύσταση των λιπιδίων.<sup>140</sup> Παρά το γεγονός ότι το οικονομικό κόστος από τη χρήση του ζωικού δέρματος είναι πολύ χαμηλότερο από εκείνο του ανθρώπινου, τα θέματα της μεταβλητότητας των δεδομένων και της ηθικής έχουν οδηγήσει τους επιστήμονες να αναπτύξουν πολλές μορφές συνθετικών μεμβρανών ώστε να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα.<sup>141</sup>

### 3.3.3 Τεχνητές μεμβράνες

Η σχετική δυσκολία απόκτησης ανθρώπινων δειγμάτων δέρματος και η υψηλή μεταβλητότητα των ζωικών μοντέλων, οδήγησαν τους επιστήμονες στη χρήση τεχνητών μεμβρανών.<sup>121</sup> Η εμπορική διαθεσιμότητα, η σταθερότητα, η ομοιομορφία μεταξύ των παρτίδων και η ευκολία τους καθιστούν τη χρήση συνθετικών μέσων ιδιαίτερα επιθυμητή.<sup>140</sup> Οι συνθετικές μεμβράνες που χρησιμοποιούνται στις μελέτες διάχυσης φαρμάκων έχουν δύο λειτουργίες, την προσομοίωση του δέρματος και τον

ποιοτικό έλεγχο.<sup>144</sup> Ωστόσο, εξακολουθεί να είναι δύσκολη η επιλογή της μεμβράνης δεδομένου ότι εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες μιας ένωσης και τη σχέση μεταξύ μεμβράνης και ένωσης.<sup>145</sup> Οι ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες τους προέρχονται κυρίως από τη μέθοδο παρασκευής που χρησιμοποιείται, έτσι είναι ζωτικής σημασίας να έχουμε μια αναπαραγωγίσιμη τεχνική κατασκευής για την αποφυγή της μεταβλητότητας μεταξύ των πειραμάτων.<sup>141</sup>

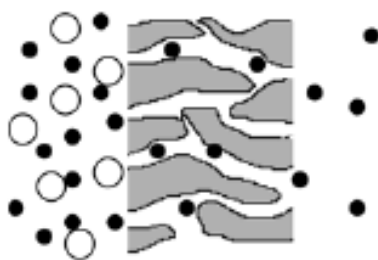
### 3.3.3.1 Τεχνητές μεμβράνες ποιοτικού ελέγχου

Οι μεμβράνες για τον έλεγχο της ποιότητας θα πρέπει να έχουν ελάχιστη αντίσταση στη διάχυση των ενώσεων, να δρουν ως στήριγμα για το διαχωρισμό του σκευάσματος από το διαμέρισμα του υποδοχέα, και όχι ως εμπόδιο, και να ενεργούν ως «συνεχές» μέσο για το μέσο του υποδοχέα. Επιπλέον, δεν πρέπει να υπάρχει καμία φυσικοχημική αλληλεπίδραση μεταξύ της μεμβράνης και του σκευάσματος δοκιμής.<sup>144,145</sup> Συνεπώς, σε αυτά τα πειραματικά μοντέλα, ο ρυθμός διάχυσης καθορίζεται από τη συγκέντρωση της υπό εξέταση ουσίας και το μήκος της οδού διάχυσης. Παρά το γεγονός ότι ο μηχανισμός αυτός δεν είναι αντιπροσωπευτικός της διάχυσης μέσω άθικτου δέρματος, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για κατεστραμμένο δέρμα, όπου το μοναδικό εναπομένον εμπόδιο είναι το χόριο.<sup>27</sup>

Αυτές οι συνθετικές μεμβράνες συχνά περιέχουν πόρους και για αυτό ονομάζονται πορώδεις μεμβράνες. Μια μεγάλη ποικιλία από πορώδεις, συνθετικές και ημισυνθετικές μεμβράνες είναι εμπορικά διαθέσιμες στην αγορά. Τις δύο τελευταίες δεκαετίες, σε ένα μεγάλο μέρος των ερευνών εκτίμησης της τοπικής διάχυσης φαρμάκων έχουν χρησιμοποιηθεί πορώδεις συνθετικές μεμβράνες, οι οποίες συνήθως δανείζονται από εφαρμογές διαχωρισμού και διήθησης.<sup>144</sup>

Οι πορώδεις μεμβράνες είναι δομικά άκαμπτες και περιέχουν τυχαία κατανεμημένα, διασυνδεδεμένα κενά όγκων, τους πόρους (Εικόνα 30).<sup>146</sup> Η δυναμική του φράγματος των πορωδών μεμβρανών υπαγορεύεται από την είσοδο και τη διάχυση της ουσίας μέσω των πόρων, και των παραγόντων που διέπουν την εκλεκτικότητα ως προς τη διάχυση όπως το σχετικό μοριακό μέγεθος, το μοριακό σχήμα και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τη μεμβράνη.<sup>140</sup> Πιο συγκεκριμένα, η διάχυση των δραστικών ενώσεων εξαρτάται από τα συστατικά της μεμβράνης και το μέγεθος των πόρων της.<sup>145</sup> Το μέγεθος των πόρων είναι ένας απίστευτα ισχυρός παράγοντας, που υποδεικνύεται από το ελάχιστο μοριακό βάρος συγκράτησης της ουσίας (cut-off)

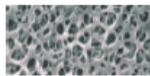
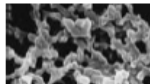
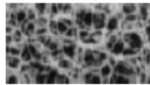
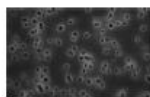


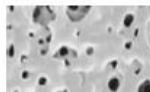
και προσδιορίζει τη σχέση μεταξύ του μεγέθους του διαπερνόντος μορίου και την πιθανότητα πραγματοποίησης της διαπέρασης.<sup>141</sup> Σωματίδια μεγαλύτερα από τους μεγαλύτερους πόρους απορρίπτονται εντελώς από τη μεμβράνη, ενώ σωματίδια μικρότερα από τους μικρότερους πόρους διαχέονται ελεύθερα μέσω της μεμβράνης. Με άλλα λόγια, η διάχυση των μορίων της ουσίας σε μια πορώδη μεμβράνη είναι ένας μηχανισμός κοσκινίσματος, υπό την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της διαλυμένης ουσίας και της μεμβράνης.<sup>146</sup> Το πορώδες και η στρεβλότητα χρησιμοποιούνται συχνά για να καθορίσουν τη δομή των πορωδών συνθετικών μεμβρανών.<sup>141</sup>



Εικόνα 30<sup>146</sup>: Απεικόνιση της διαπέρασης των μορίων της ουσίας διαμέσου πορώδης μεμβράνης.

Κυριότερος εκπρόσωπος των πορωδών μεμβρανών είναι οι μεμβράνες κυτταρίνης και τα παράγωγά τους, στις οποίες περιλαμβάνονται η οξική κυτταρίνη, οι εστέρες κυτταρίνης, και/ή νιτρική κυτταρίνη.<sup>145</sup> Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και πολυμερικές μεμβράνες όπως πολυανθρακικές, πολυαμιδίων (πχ. nylon), πολυτετραφθοροαιθυλένιου, πολυαιθεροσουλφόνης, και πολυσουλφόνης (Πίνακας 3).<sup>145,146</sup> Οι πολυμερικές μεμβράνες χρησιμοποιούνται λιγότερο από τις μεμβράνες κυτταρίνης λόγω του υψηλότερου κόστους και της χαμηλής διαθεσιμότητάς τους.<sup>146</sup>

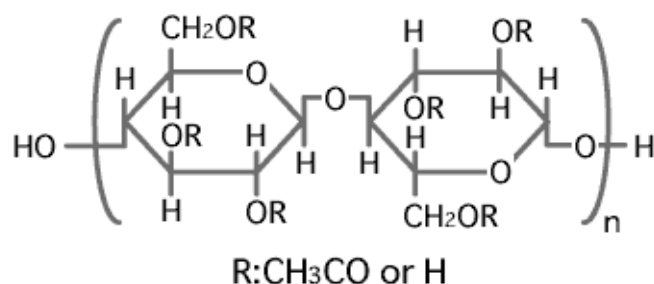


Membrane	Material	Pore size ( $\mu\text{m}$ )	Thickness ( $\mu\text{m}$ )	Source	Batch no.	Image
<i>Cellulose-based</i>						
Advantec	Cellulose acetate	0.2	125	Advantec	81216306	
Advantec	Cellulose acetate	0.45	125	Advantec	90401306	
Metricel	Mixed cellulose esters	0.45	152	Pall	T10896	–
MF	Cellulose acetate/nitrate mixtures	0.45	150	Millipore	R0PA12528	
MRC RC	Regenerated cellulose	0.45	160	Chm	0800243	
S-Pak	Mixed cellulose esters	0.45	–	Millipore	F0KA39876	–
<i>Polymeric-based</i>						
Isopore	Isopore track-etched polycarbonate	0.4	7–22	Millipore	R1DA59364	
MTF PTEF	Polytetrafluoroethylene	0.45	65–100	Chm	0904460	
NL16	Polyamide	0.2	110	Whatman	9156262	
NL17	Polyamide	0.45	110	Whatman	9063230	
Supor	Polyethersulfone	0.2	145	Pall	T03752	–
Tuffryn	Polysulfone	0.45	145	Pall	T91318	

Πίνακας 3<sup>145</sup>: Βασικές ιδιότητες εμπορικά διαθέσιμων πορώδων μεμβρανών.

Η μεμβράνη οξικής κυτταρίνης έχει μία σχετικά άκαμπτη δομή που αποτελείται από δακτυλίους γλυκοπυρανόζης ενωμένους μεταξύ τους με  $\beta$ -1,4-δεσμούς (Εικόνα 31). Αυτή η διαμόρφωση επιτρέπει μόνο δύο είδη κινήσεων στις αλυσίδες: την αναστροφή του δακτυλίου πυρανόζης ή την περιστροφή γύρω από τη γλυκοζιτική σύνδεση. Επιπλέον, στην κυτταρίνη υπάρχουν αλυσίδες σε μια μερικώς κρυσταλλική μορφή λόγω της ύπαρξης δεσμών υδρογόνου στην αλυσίδα.<sup>140</sup> Οι εμπορικές μεμβράνες

κυτταρίνης έχουν cut off μοριακό βάρος από 8000-15000 Daltons και συνήθως περιέχουν έναν αριθμό μαλακτικών, συντηρητικών και πλαστικοποιητών πρόσθετων για ευκολία στη μεταφορά και το χειρισμό, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τη διείσδυση του φαρμάκου, για αυτό απαιτείται επεξεργασία της μεμβράνης πριν από τα πειράματα.<sup>140,146</sup> Γενικά, οι μεμβράνες κυτταρίνης είναι περισσότερο διαπερατές από τις βιολογικές μεμβράνες ή τα μη πορώδη συνθετικά μέσα.<sup>140</sup>



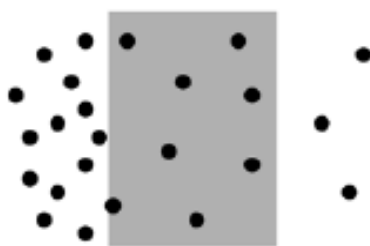
Εικόνα 31<sup>147</sup>: Χημική δομή οξικής κυτταρίνης.

### 3.3.3.2 Τεχνητές μεμβράνες προσομοίωσης του δέρματος

Η συντριπτική πλειοψηφία των εργασιών στον τομέα των συνθετικών μεμβρανών για μελέτες διαδερμικής και τοπικής χορήγησης έχει εστιάσει στη χρήση μεμβρανών που έχουν υδρόφοβο χαρακτήρα, κατέχουν ιδιότητες περιοριστικού ρυθμού και μπορούν να προσομοιώσουν το δέρμα.<sup>145</sup> Έχει προταθεί ότι οι τεχνητές μεμβράνες μπορούν να προσφέρουν χρήσιμη πρόβλεψη της in vivo διαδερμικής χορήγησης όταν πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια<sup>27</sup>:

- Η παθητική διάχυση μέσω της κεράτινης στιβάδας είναι η κύρια αντίσταση στην μεταφορά της ουσίας.
- Το υπό εξέταση φάρμακο είναι γνωστό ότι είναι μεταβολικά αδρανές και δε δεσμεύεται στο βιώσιμο δέρμα.
- Το σκεύασμα δεν περιέχει κάποιο ενισχυτή διαπερατότητας ο οποίος μπορεί να αλληλεπιδράσει με το δέρμα αλλά όχι με τη μεμβράνη.
- In vivo πειράματα μπορούν να εκτελεστούν και να συσχετιστούν με in vitro αποτελέσματα.

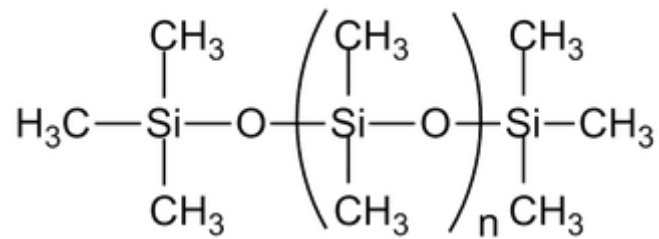
Οι μη πορώδεις μεμβράνες φαίνεται να προσφέρουν κάποιο παράγοντα περιοριστικό του ρυθμού ως προς τη διαπέραση και μπορούν, ως εκ τούτου, να προσομοιώνουν στενότερα τη διάχυση μέσω βιολογικών ιστών. Οι ιδιότητες του φραγμού σχετίζονται γενικά με τη διαλυτότητα του διαχεόμενου μορίου στη μεμβράνη και την ευκολία του μορίου να περνά διαμέσου αυτής (Εικόνα 32).<sup>140</sup> Για μια μη πορώδη μεμβράνη, η διαπέραση συμβαίνει σε τρία στάδια, πρώτον, το διαπεραστικό μόριο διαλύεται στη μεμβράνη, δεύτερον, διαχέεται μέσω της μεμβράνης και, τελικά, προκύπτει μέσα από την μεμβράνη. Αυτή η διαδικασία ακολουθεί τον πρώτο νόμο διάχυσης του Fick και η διείσδυση εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ένωσης και της μεμβράνης, με παρόμοιο τρόπο με αυτόν που παρατηρείται μεταξύ της ένωσης και της υδρόφοβης κεράτινης στοιβάδας.<sup>141</sup>



Εικόνα 32<sup>146</sup>: Απεικόνιση της διαπέρασης των μορίων της ουσίας διαμέσου μη πορώδους μεμβράνης.

Η μεμβράνη σιλικόνης είναι ένα τυπικό απλό μοντέλο υδρόφοβης μεμβράνης που προσομοιώνει το δέρμα και εμφανίζει υψηλή διαπερατότητα για τις μη ιονικές φαρμακευτικές ενώσεις και, ως εκ τούτου, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αξιολόγηση των ιδιοτήτων διαπερατότητας διαφόρων ενώσεων και την πρόβλεψη της διεισδύσεως φαρμάκων διαμέσου του ανθρώπινου δέρματος.<sup>27,144,140</sup> Η μεμβράνη πολυδιμεθυλοσιλοξανίου (PDMS) είναι ιδανική για την αντικατάσταση ex vivo δέρματος, δεδομένου ότι μπορεί να συντεθεί σε ένα επιθυμητό πάχος, είναι εύκολη στο χειρισμό και την αποθήκευση, επιδεικνύει καλή σταθερότητα, είναι οικονομική, αδρανής, υψηλής ποιότητας και παρέχει αναπαραγώγιμα δεδομένα (Εικόνα 33).<sup>132,141</sup>

Δεν χρησιμοποιείται σε μελέτες ελέγχου ποιότητας επειδή δεν μπορεί να ανιχνεύσει την ποιότητα του προϊόντος και, επίσης, αυξάνει το χρόνο των μελετών αφού η απελευθέρωση της ουσίας μέσω της μεμβράνης είναι αργή.<sup>146</sup>



Εικόνα 33<sup>148</sup>: Χημική δομή πολυδιμεθυλοσιλοξανίου.

Οι παράμετροι που καθορίζουν τη διάχυση διαμέσου της PDMS φαίνεται να είναι η κινητικότητα της πολυμερικής αλυσίδας της (ακαμψία) και η διαλυτότητα του διαχεόμενου μορίου στην πολυμερική μήτρα (η οποία επηρεάζει τον συντελεστή μερισμού). Πιο αναλυτικά, η μεταφορά μάζας μέσω της μήτρας εξαρτάται από τη συχνότητα σχηματισμού κενών, επαρκούς όγκου, τα οποία σχηματίζονται από την τυχαία ταλάντωση των πολυμερικών αλυσίδων και φιλοξενούν το διαχεόμενο μόριο. Ο βαθμός σχηματισμού δεσμών μεταξύ των αλυσίδων του πολυμερούς καθορίζει την ακαμψία της μήτρας και, ως εκ τούτου, τη ροπή σχηματισμού οπών και την προκύπτουσα διαπερατότητα.<sup>140</sup>

Συνήθως, οι μεμβράνες σιλικόνης μπορούν να αποστέλλονται από το κατασκευαστή καλυμμένες με ένα φιλμ σκόνης, το οποίο αφαιρείται πριν από την χρήση ξεπλένοντάς το με νερό, για να διευκολυνθεί ο χειρισμός και η συσκευασία των συνθετικών φύλλων.<sup>140</sup>

Παρόλα αυτά, αν και χρησιμοποιείται ευρέως, η PDMS δεν περιλαμβάνει όλα εκείνα τα δομικά χαρακτηριστικά που απαιτούνται για την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν κατά τη μεταφορά μέσω των μεσοκυττάρων καναλιών.<sup>27</sup> Επιπλέον, η διαπερατότητα υδρόφιλων ενώσεων διαμέσου αυτής είναι συχνά μη ανιχνεύσιμη λόγω της εξαιρετικά λιπόφιλης φύσης της και της μη πορώδους δομής της, ενώ υδρόφιλες ενώσεις όπως το νερό και η μαννιτόλη διαπερνούν το ανθρώπινο δέρμα.<sup>132</sup>

Πέρα από τις μεμβράνες σιλικόνης, έχουν μελετηθεί οργανικές μεμβράνες οι οποίες περιέχουν υδρογονάνθρακες, μακριές αλυσίδες αλκοολών ή μυριστικό ισοπροπύλιο. Επιπλέον, έχουν προταθεί συστήματα που αντιγράφουν τη λειτουργία του επιδερμικού φραγμού και περιέχουν φυσικά υλικά (πχ. eggshell μεμβράνη) ή

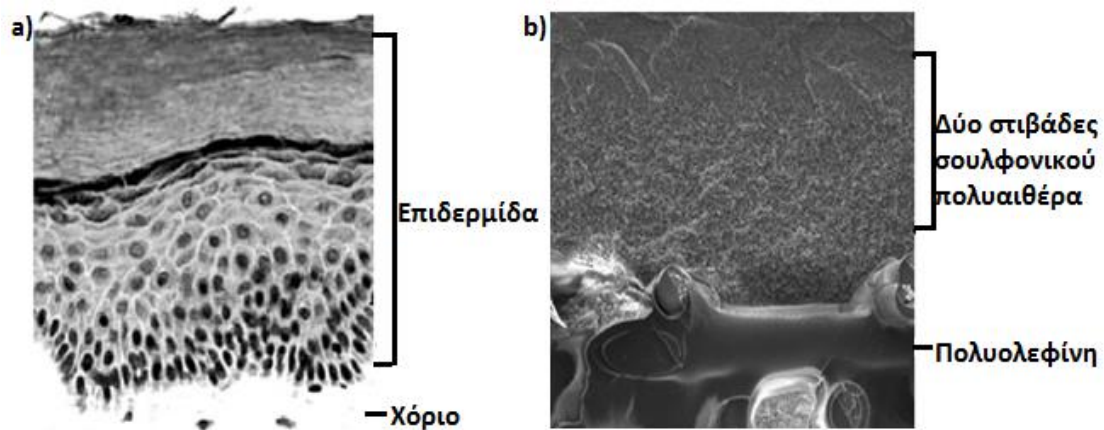
συνθετικά υλικά (πχ. πολυπροπυλένιο, εστέρες κυτταρίνης, πολυαιθυλένιο, πολύ(οξικό βινύλιο)).<sup>27</sup>

Πολλοί ερευνητές εμπνεύστηκαν από τη λιπιδική μήτρα της κεράτινης στιβάδας και χρησιμοποίησαν λιπίδια του δέρματος, ή λιποσώματα που περιλαμβάνουν διάφορα λιπίδια του δέρματος, στις μελέτες διαδερμικής και τοπικής χορήγησης.<sup>27</sup> Πιο πρόσφατες πρόοδοι έχουν δει την σύνθεση ανθρώπινων ανάλογων κεραμιδίων, που αναφέρονται ως κερτραμίδια, ενσωματωμένα σε μίγμα μεμβράνης που περιέχει ελεύθερα λιπαρά οξέα και χοληστερόλη για καλύτερη προσομοίωση της κεράτινης στιβάδας. Αυτά τα νέα κερτραμίδια είναι δομικά παρόμοια με τα φυσικά κεραμίδια και έχουν συγκρίσιμο μοριακό μέγεθος, ικανότητες δεσμών-H δότη/δέκτη, και υψηλή λιποφιλία.<sup>120</sup>

Τελευταία έχουν χρησιμοποιηθεί συνθετικά εμβολιασμένα συμπολυμερή (graft copolymers) που προσομοιώνουν την ετερογένεια των περιοχών του δέρματος και μέχρι στιγμής έχουν αποδειχθεί σχετικά χρήσιμα μοντέλα για την ποσοτική αξιολόγηση της διαδερμικής διείσδυσης.<sup>27</sup>

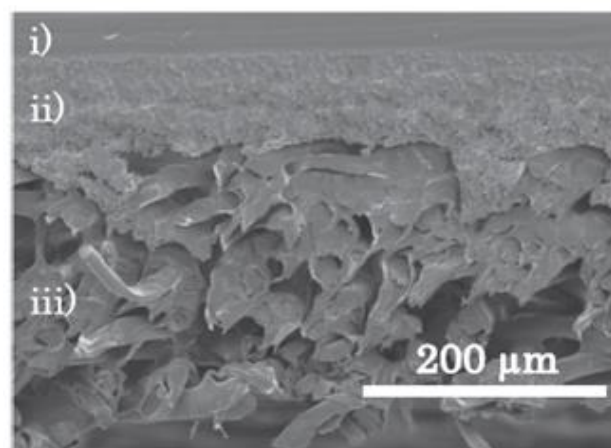
### **3.3.3.3 STRAT-M™ μεμβράνη**

Πρόσφατα, εισήχθη στο εμπόριο μια νέα συνθετική μεμβράνη ως υποκατάστατο του ανθρώπινου ή ζωικού δέρματος στις *in vitro* μελέτες διάχυσης, η Strat-M™ (Merck Millipore, USA).<sup>149</sup> Η Strat-M™ περιλαμβάνει ένα άνω στρώμα που υποστηρίζεται από μία πορώδη υποδομή δεσμευμένη σε ένα ύφασμα υποστήριξης. Είναι μία υπερδιηθημένη συνθετική μεμβράνη πολλαπλών στρωμάτων με παρόμοια μορφολογία με αυτή του ανθρώπινου δέρματος (Εικόνα 34). Τόσο το ανθρώπινο δέρμα όσο και η μεμβράνη έχουν μία πολυστρωματική δομή με ένα πολύ στενό επιφανειακό άνω στρώμα.<sup>120,137</sup> Αποτελείται από δύο στρώματα σουλφονικού πολυαιθέρα (PES), ανθεκτικά στη διάχυση, τα οποία βρίσκονται στην κορυφή ενός στρώματος πολυολεφίνης που είναι πιο ανοικτό και παρουσιάζει μεγαλύτερη διάχυση.<sup>149,150</sup>



Εικόνα 34<sup>150,151</sup>: Η ομοιότητα στη δομή μεταξύ των στιβάδων του ανθρώπινου δέρματος (a) και της Strat-M<sup>TM</sup> (b).

Τα πολυμερικά στρώματα δημιουργούν μια πορώδη δομή με μία διαβάθμιση κατά μήκος της μεμβράνης από την άποψη του μεγέθους των πόρων και της διαχύσεως.<sup>150</sup> Η πυκνότητα τους μειώνεται σταδιακά διαμέσου του βάθους της μεμβράνης ενώ ταυτόχρονα είναι όλο και πιο πορώδη και παχιά (Εικόνα 35).<sup>137,138,152</sup> Ξεκινώντας από την κορυφή της μεμβράνης, το πάχος τους είναι  $52.3 \pm 0.5$ ,  $76.7 \pm 5.07$  και  $196 \pm 7.37$   $\mu\text{m}$  (μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση) αντίστοιχα, ενώ το συνολικό πάχος της είναι  $324.6 \pm 4.6$   $\mu\text{m}$ .<sup>152</sup>



Εικόνα 35<sup>152</sup>: Εικόνα SEM (scanning electron microscopic) κάθετης τομής της Strat-M<sup>TM</sup> που περιλαμβάνει το πρώτο (i), το δεύτερο (ii) και τρίτο στρώμα (iii).

Η πορώδης δομή της είναι εμποτισμένη με ένα μείγμα συνθετικών χημικών λιπιδίων με σκοπό να μιμηθεί την παρουσία των λιπιδίων του ανθρώπινου δέρματος, όπως φωσφολιπίδια και κεραμίδια, και να αποκτήσει υδρόφοβο χαρακτήρα.<sup>120,137,150</sup>

Η συνθετική μεμβράνη χαρακτηρίζεται από χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών παρτίδων, παρέχοντας έτσι περισσότερο συνεπή δεδομένα. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα δεδομένα διάχυσης της Strat-M™ μεμβράνης συσχετίζονται καλά με αυτά του ανθρώπινου δέρματος.<sup>120,149</sup> Η ευρεία χρήση της οφείλεται, επίσης, στο γεγονός ότι δεν έχει περιορισμούς ασφάλειας και αποθήκευσης καθώς είναι σταθερή και δεν απαιτεί ιδιαίτερους τρόπους αποθήκευσης, είναι συσκευασμένη σε δίσκους και απλοποιεί έτσι την τοποθέτησή της στα κύτταρα Franz και, τέλος, δεν χρειάζεται ενυδάτωση πριν από τη χρήση της, σε αντίθεση με το δέρμα.<sup>120,150</sup>

Αν και παρέχει ουσιαστικές και επαναλήψιμες πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά διαπερατότητας της ένωσης διαμέσου του δέρματος, δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί η δυναμική της.<sup>138,152</sup>

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της μελέτης μας είναι η αξιολόγηση της τεχνητής μεμβράνης Strat-M™ (Merck Millipore, USA), ως υποκατάστατο του ανθρώπινου ή ζωικού δέρματος στις in vitro μελέτες διάχυσης, και η εγκαθίδρυση in vitro-in vivo συσχετίσεων.

Παρότι το ανθρώπινο δέρμα είναι η μεμβράνης επιλογής στα in vitro πειράματα διαπεράσεως, παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες όπως υψηλή μεταβλητότητα ανάλογα με το δόση από τον οποίο προέρχεται, περιορισμένη διαθεσιμότητα, ευαισθησία στις συνθήκες αποθήκευσης, οικονομικοί περιορισμοί, ειδική προεργασία. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η εύρεση μίας εμπορικά συνθετικής μεμβράνης χαμηλού κόστους, με επαναλήψιμα αποτελέσματα, υψηλή σταθερότητα, και ευκολία στη χρήση η οποία θα μιμείται το ανθρώπινο δέρμα και θα μπορεί να αξιολογήσει τη διείσδυση υποψηφίων τοπικών ή διαδερμικών φαρμάκων.

Όσον αφορά τις in vitro-in vivo συσχετίσεις, είναι γνωστό ότι εφαρμόζονται ευρέως στα από του στόματος χορηγούμενα φαρμακευτικά προϊόντα διότι μέσα από τα in vitro πειράματα μπορεί να εκτιμηθεί η συμπεριφορά του φαρμάκου in vivo. Επιπλέον, σε περιπτώσεις όπου υπάρχει σαφής σχέση μεταξύ in vitro και in vivo δεδομένων, τα in vitro πειράματα δύναται να υποκαταστήσουν τις in vivo μελέτες σε μελέτες βιοϊσοδυναμίας.

Σε αυτό το πλαίσιο, χρησιμοποιήθηκαν διαδερμικά θεραπευτικά συστήματα νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης για τη μελέτη της in vitro διαπεράσεως των ουσιών διαμέσου της μεμβράνης StratM και της απομονωμένης ανθρώπινης επιδερμίδας, ενώ για την εγκαθίδρυση in vitro-in vivo συσχετίσεων, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα in vitro πειράματα συσχετίστηκαν με βιβλιογραφικά δεδομένα in vivo.



## B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1 Υλικά, όργανα και συσκευές

#### 1.1.1 Υλικά

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων που περιλαμβάνονται στη παρούσα μεταπτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθως αναφερόμενα όργανα και αντιδραστήρια. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν καθαρότητας αναλυτικού βαθμού και δε χρειάστηκαν περαιτέρω επεξεργασία.

#### 1) Νιτρογλυκερίνη

Το προϊόν που ελέγχθηκε είναι:

- Nitrong TTS 5MG/24h lot No 50504, Lavipharm HELLAS A.E. (Paiania, Athens, Greece)

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι :

- Μεθανόλη βαθμού HPLC, Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)
- Ακετονιτρίλιο βαθμού HPLC, Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)
- Νερό βαθμού HPLC
- Υδροξείδιο του Νατρίου 1mol/ L, Chemlab (Belgium)
- Δισόξινο ορθοφωσφορικό νάτριο-δισένυδρο  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Lach-ner (Neratovice, Czech Republic)
- Strat-M Membrane, lot No K5JA1303, EMD Millipore Corporation (Darmstadt, Germany)
- N-Betalactose, lot No xxxLAV0001, Lavipharm (Paiania, Athens, Greece)
- Μεμβράνη Strat-M™

## 2) Νικοτίνη

Το προϊόν που ελέγχθηκε είναι:

- Nicorette clear patch TTS 10MG/16h lot No 6507801, Johnson & Johnson Hellas A.E. (Marousi, Athens, Greece)

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι :

- Νερό βαθμού HPLC
- Δισόξινο ορθοφωσφορικό κάλιο  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , EMD Millipore Corporation (Darmstadt, Germany)
- Δισόξινο ορθοφωσφορικό νάτριο-δισένυδρο  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Lach-ner (Neratovice, Czech Republic)
- Strat-M Membrane, lot No K5JA1303, EMD Millipore Corporation (Darmstadt, Germany)
- Μεθανόλη βαθμού HPLC, Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)
- Nicotine, lot No BCBS3296V, Sigma-Aldrich, (Germany)
- Μεμβράνη Strat-M™

### 1.1.2 Όργανα και συσκευές

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

- Ηλεκτρονικός ζυγός: Mettler Toledo AT 261, Delta Range® (Mettler, Switzerland)
- Υδατόλουτρο υπερήχων: Branson Sonicator 5200 (Branson, U.S.A.)
- Σύστημα παραγωγής απιονισμένου νερού βαθμού HPLC
- Μαγνητικοί αναδευτήρες: Nuova II stir Plate (Barnstead, Thermolyne, U.S.A.) και Cimarec 3, (Thermolyne, U.S.A.)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό: Millipore
- Συσκευή φυγοκέντρωσης (Sigma 202 MK, Sigma, Germany)
- Φίλτρα για τη συσκευή διήθησης υπό κενό Millipore: Cronus® Membrane filters, nylon 47mm, 0.45  $\mu\text{m}$

- Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (HPLC), που περιλαμβάνει:
  - Αντλία υψηλής πίεσεως Spectra System P1000 (Spectra PHysics, U.S.A.)
  - Αυτόματος δειγματολήπτης (auto sampler) Spectra System AS1000 (Spectra PHysics, U.S.A.)
  - Hypersil<sup>®</sup> BDS C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Thermo Electron Corporation, UK)
  - Spherisorb ODS2 C18 column (250 x 4,6 mm, 5μ, Waters, U.K.)
  - Ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Spectra System 2000 (Thermo Separation Products, U.S.A.) ρυθμισμένο σε  $\lambda_{max} = 278$  nm.
  - Μονάδα ελέγχου του συστήματος από ηλεκτρονικό υπολογιστή Spectra System SN 4000 (Thermo Separation Products, U.S.A.)
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή (Thermo Quest, Inc., U.S.A.) με λογισμικό Chromquest<sup>®</sup>, Version 5.1 (ThermoQuest, U.K.).
- Κλίβανος: WT binder (Germany)
- Περιστρεφόμενος αναδευτήρας: SBS - Roller (SBS, Spain)
- Perkin Elmer Lambda 6 UV/Vis spectrophotometer, εξοπλισμένο με PECSS Perkin Elmer v. 3.26 software (Perkin Elmer, U.S.A.)
- Τροποποιημένα κύτταρα Franz (Crown Glass, Somerville, U.S.A.), με εμβαδόν ανοίγματος 0.636 cm<sup>2</sup> και όγκο διαμερίσματος δέκτη 6.275 ml.
- Θερμορρυθμιστής: Edmund Bühler 7400 (Tübingen, Germany).
- Υδατόλουτρο: Edmund Bühler D-7400 (Tübingen, Germany).
- Μαγνητική πλάκα ανάδευσης Cimarec 3, (Thermolyne, U.S.A.)

## 1.2 Μέθοδοι

### 1.2.1 Φάσμα UV

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανάλυση των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού, είναι απαραίτητο οι μετρήσεις να πραγματοποιηθούν στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση της ουσίας ( $\lambda_{max}$ ). Αυτό συμβαίνει για δύο λόγους: α) Για την επίτευξη της μέγιστης ευαισθησίας και β) την ελαχιστοποίηση της μεταβολής των απορροφήσεων εξαιτίας μικρών μεταβολών του μήκους κύματος κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, αφού στο  $\lambda_{max}$  παρατηρείται πλατό του φάσματος απορρόφησης. Έτσι, πραγματοποιήθηκε η

λήψη του φάσματος UV της νικοτίνης στο διάλυμα του διαμερίσματος δέκτη με τη χρήση του Perkin Elmer Lambda 6 UV/Vis spectrophotometer, εξοπλισμένο με PECSS Perkin Elmer v. 3.26 software (Perkin Elmer, U.S.A.).

Μετά από μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού με διάλυμα από το διαμέρισμα δέκτη, ελήφθη το φάσμα απορρόφησης της ουσίας σε κυψελίδα από χαλαζία πάχους 1 cm (No 6030-UV, Helma, Γερμανία).

Για τη νιτρογλυκερίνη χρησιμοποιήθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα.

## 1.2.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

### 1.2.2.1 Συνθήκες ανάλυσης

#### 1) Νιτρογλυκερίνη

Για την ανάλυση των προτύπων και δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε τροποποίηση δημοσιευμένων μεθόδων υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Πίνακας 4).<sup>63,153,154</sup>

<b>Υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC)</b>	
<b>Δραστική ουσία</b>	<b>Νιτρογλυκερίνη</b>
<b>Είδος στήλης</b>	<b>Hypersil® BDS C18, 5μm, 250 cm x 4.6 mm</b>
<b>Κινητή φάση</b>	<b>MeOH:H<sub>2</sub>O, 60 : 40 %v/v</b>
<b>Ροή</b>	<b>1.0 ml/min</b>
<b>Μήκος κύματος ανιχνευτή</b>	<b>220 nm</b>
<b>Όγκος δείγματος (loop)</b>	<b>50 μl</b>
<b>Θερμοκρασία</b>	<b>≈25 °C</b>

Πίνακας 4: Συνθήκες ανάλυσης της νιτρογλυκερίνης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

## 2) Νικοτίνη

Για την ανάλυση των προτύπων και δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε τροποποίηση δημοσιευμένης μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Πίνακας 5).<sup>155</sup>

<b>Υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC)</b>	
<b>Δραστική ουσία</b>	<b>Νικοτίνη</b>
<b>Είδος στήλης</b>	<b>Spherisorb ODS2 C18, 250 x 4,6 mm, 5μ</b>
<b>Κινητή φάση</b>	<b>MeOH:Phosphate buffer (pH 6,8, 10mM), 80 : 20 % v/v</b>
<b>Ροή</b>	<b>1.2 ml/min</b>
<b>Μήκος κύματος ανιχνευτή</b>	<b>261 nm</b>
<b>Όγκος δείγματος (loop)</b>	<b>50 μl</b>
<b>Θερμοκρασία</b>	<b>≈25 °C</b>

Πίνακας 5: Συνθήκες ανάλυσης της νικοτίνης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

### 1.2.2.2 Παρασκευή κινητής φάσεως

#### 1) Νιτρογλυκερίνη

Για την παρασκευή της κινητής φάσης μετρώνται με ογκομετρικό κύλινδρο 1200 mL MeOH και 800 mL H<sub>2</sub>O βαθμού HPLC και μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως 2000ml. Ακολουθεί καλή ανάμειξη και έπειτα η κινητή φάση διηθείται υπό κενό στη συσκευή Millipore χρησιμοποιώντας φίλτρα Durapore<sup>®</sup> Membrane filters, 0.45 μm HV για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων. Τέλος, το διάλυμα τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά με σκοπό την απαέρωσή του.

#### 2) Νικοτίνη

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος PBS ζυγίζονται αρχικά 1,3608 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, και μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως 1000ml. Ακολουθεί προσθήκη H<sub>2</sub>O βαθμού HPLC περίπου μέχρι τα 1000 ml και ανάδευση του διαλύματος. Μόλις διαλυθεί το άλας, μετράται το pH του διαλύματος και προσαρμόζεται στην τιμή 6.8 με διάλυμα NaOH κανονικότητας 1M. Στη συνέχεια αναμιγνύονται 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS με 800 ml MeOH. Ακολουθεί καλή ανακίνηση και διήθηση υπό κενό στη συσκευή Millipore χρησιμοποιώντας φίλτρα. Τέλος, η κινητή φάση τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά με σκοπό την απαέρωσή της.

### 1.2.2.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

Τα πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 6), παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις από μητρικό διάλυμα (stock solution). Για την παρασκευή του μητρικού διαλύματος νιτρογλυκερίνης, ζυγίζονται σε ποτήρι ζέσεως 0,10173 g N-Betalactose (δραστική ουσία). Έπειτα μετρώνται με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου περίπου 120 mL CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O βαθμού HPLC (55:45 %v/v). 100mL του διαλύματος προστίθενται στο ποτήρι ζέσεως, με ταυτόχρονη ανάδευση, μέχρι διάλυση της δραστικής ουσίας. Το διάλυμα της δραστικής ουσίας μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και αραιώνεται μέχρι χαραγής με το διάλυμα του CH<sub>3</sub>CN. Η συγκέντρωση του μητρικού διαλύματος που προκύπτει είναι 100μg/ml. Για την παρασκευή μητρικού διαλύματος νικοτίνης συγκέντρωσης 100μg/mL, ζυγίζονται 0,01g νικοτίνης και αραιώνονται με MeOH καθαρότητας βαθμού HPLC μέχρι τη χαραγή σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σε εύρος συγκεντρώσεων 0.7-20 μg/ml και 5-40 μg/ml, αντίστοιχα, με τη βοήθεια κατάλληλων πιπετών.

Συγκέντρωση μg/ml	Ληφθείς όγκος (μl)	Αραίωση
0,7	7000	Αραίωση προτύπου διαλύματος 1 μg/ml με κινητή φάση σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml έως τη χαραγή
1	200	Αραίωση με κινητή φάση σε ογκομετρική φιάλη των 20 ml έως τη χαραγή
3	300	Αραίωση με κινητή φάση σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml έως τη χαραγή
5	500	
7	700	
10	1000	
15	1500	
20	2000	
25	2500	
30	3000	
35	3500	
40	4000	

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης.

#### **1.2.2.4 Έλεγχος γραμμικότητας μεθόδου ανάλυσης**

Τα πρότυπα διαλύματα νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για τον έλεγχο της γραμμικότητας της μεθόδου ανάλυσης. Κάθε πρότυπο αναλύθηκε τρεις φορές (n=3). Τα αποτελέσματα (εμβαδά) που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη σταθμισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των ευθειών τους ( $y=ax+b$ ), η κλίση (a, slope), η τεταγμένη επί την αρχή (b, Y-intercept) και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης ( $R^2$ ).

#### **1.2.2.5 Έλεγχος πιθανών παρεμποδίσεων στις χρωματογραφικές κορυφές**

Το υγρό του υποδοχέα στα κύτταρα διάχυσης Franz και των δύο υπό εξέταση ουσιών είναι ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (pH=7.4). Για το έλεγχο των παρεμποδίσεων στις χρωματογραφικές κορυφές που μπορεί να προκύψουν από την παρουσία των αλάτων, παρασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης με τη συνήθη διαδικασία με τη μόνη διαφορά ότι η αραίωση του μητρικού διαλύματος πραγματοποιήθηκε με διάλυμα υποδοχέα αντί για κινητή φάση. Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν δεν παρουσίαζαν παρεμπόδιση στην εμφάνιση της κορυφής τόσο στην κορυφή της νιτρογλυκερίνης, όσο και στην κορυφή της νικοτίνης.

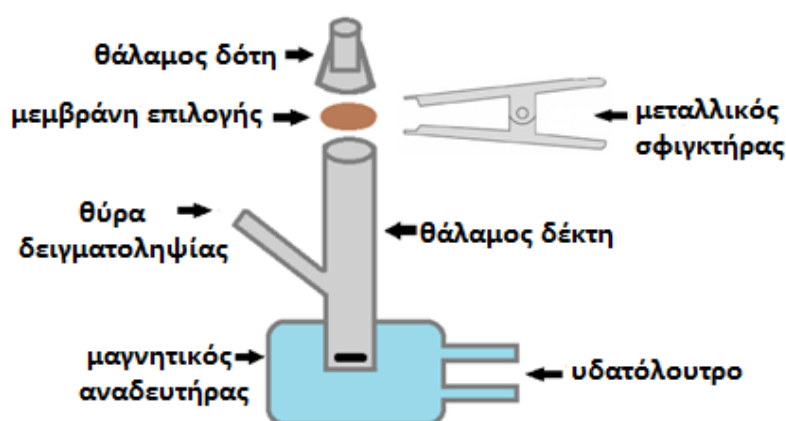
#### **1.2.2.6 Προσδιορισμός διαλυτότητας κορεσμού στο διάλυμα του υποδοχέα**

Τόσο για τη διαλυτότητα της νιτρογλυκερίνης όσο και τη διαλυτότητα της νικοτίνης στο διάλυμα του υποδοχέα, χρησιμοποιήθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα.

### **1.2.3 In vitro πειράματα μελετών διαπέρασης διαμέσου του δέρματος και της StratM**

Για την διεξαγωγή της in vitro μελέτης διαδερμικής διαπερατότητας της νιτρογλυκερίνης και της νικοτίνης χρησιμοποιήθηκαν κάθετα στατικά υάλινα κελιά διάχυσης, γνωστά ως κύτταρα Franz, όγκου 6.275 ml και διαθέσιμης επιφάνειας διάχυσης 0.636 cm<sup>2</sup> (Εικόνα 36). Η διάταξη των κελιών συνίσταται από δυο θαλάμους, τον δότη και τον δέκτη και η σταθεροποίηση της όλης διάταξης επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μεταλλικού σφιγκτήρα. Μεταξύ δότη και δέκτη παρεμβάλλεται η μεμβράνη, που στην προκειμένη περίπτωση είναι ανθρώπινο δέρμα και η σύνθετη μεμβράνη StratM. Η θερμοστάτηση του θαλάμου-δέκτη εξασφαλίζεται

μέσω βύθισής του σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $32 \pm 0.5$  °C με σκοπό την προσομοίωση της θερμοκρασίας στην επιφάνεια του ανθρώπινου δέρματος. Η ομοιογένεια του διαλύματος εντός του θαλάμου-δέκτη εξασφαλίζεται με την παρουσία μαγνητικού αναδευτήρα, καθώς η όλη διάταξη βρίσκεται σταθεροποιημένη στην επιφάνεια συστήματος μαγνητικής ανάδευσης. Τέλος, το διάλυμα του υποδοχέα δειγματοληπτείται σε καθορισμένες χρονικές στιγμές από πλευρικό βραχίονα του θαλάμου-δέκτη και αναλύεται.



Εικόνα 36: Σχηματική αναπαράσταση τροποποιημένου κυττάρου Franz.

### 1.2.3.1 Παρασκευή διαλύματος υποδοχέα

Το διάλυμα του υποδοχέα τόσο της νιτρογλυκερίνης όσο και της νικοτίνης ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος (PBS-Phosphate Buffer Saline solution) με pH 7,4. Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος PBS ζυγίζονται 1,5601g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και αφού διαλυθούν σε 2L  $\text{H}_2\text{O}$  βαθμού HPLC, προσαρμόζεται το pH στην τιμή 7.4 με διάλυμα NaOH κανονικότητας 1M. Στη συνέχεια το διάλυμα υποδοχέα διηθείται υπό κενό και, τέλος, τοποθετείται για 15 λεπτά στο λουτρό υπερήχων για να απαερωθεί.

### 1.2.3.2 Μεμβράνη επιλογής

#### 1.2.3.2.1 Ανθρώπινο δέρμα

Το δέρμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα διάχυσης ήταν κεράτινη στιβάδα ανθρώπινου δέρματος το οποίο προήλθε από πλαστικές επεμβάσεις κοιλίας, από διαφορετικό δότη για κάθε ουσία. Ο διαχωρισμός της επιδερμίδας από το χόριο έγινε με τη μέθοδο του θερμικού διαχωρισμού (heat separation technique), όπως περιγράφηκε από τον Klingman. Πιο συγκεκριμένα, το δέρμα πλήρες πάχους



απομακρύνθηκε από τον καταψύκτη μέχρι να πάρει θερμοκρασία περιβάλλοντος και τοποθετήθηκε σε απορροφητικό χαρτί ώστε να μη γλιστράει. Το υποδόριο λίπος και το μεγαλύτερο μέρος του χορίου αφαιρέθηκαν με τη βοήθεια νυστεριού και λαβίδας. Στην συνέχεια εμβαπίστηκε σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 600 mL απιονισμένου νερού, θερμοκρασίας 60°C, για ένα λεπτό ώστε να χαλαρώσουν οι δεσμοί μεταξύ των υποκείμενων στιβάδων και να είναι ευκολότερος ο διαχωρισμός τους. Έτσι, η επιδερμίδα απομακρύνθηκε από το κυρίως δέρμα με την βοήθεια λαβίδων και απομονώθηκε η κεράτινη στιβάδα. Τέλος, η κεράτινη στιβάδα απλώθηκε σε φύλλο αλουμινίου και μέχρι να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα διάχυσης φυλάχθηκε στον καταψύκτη στους -10°C.

#### 1.2.3.2.2 Μembrάνη Strat-M™

Η μεμβράνη Strat-M™ χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της δυναμικής της ως υποκατάστατο του ανθρώπινου ή ζωικού δέρματος στις in vitro μελέτες διάχυσης. Χάρη στην κατασκευή της, δεν απαιτεί κατεργασία πριν τη χρήση της στα πειράματα διάχυσης. Επιπλέον, είναι συσκευασμένη σε δίσκους, απλοποιώντας την τοποθέτησή της στα κυττάρια Franz. Έτσι, αφού αφαιρέθηκε το προστατευτικό της κάλυμμα, τοποθετήθηκε πάνω στο διαμέρισμα του δέκτη με τη γυαλιστερή επιφάνεια προς το διαμέρισμα του δότη.



Εικόνα 37<sup>156</sup>: Μembrάνη Strat-M™.

### 1.2.3.3 Περιγραφή πειράματος διάχυσης

Η μεθοδολογία των πειραμάτων διάχυσης ήταν ίδια για τη νιτρογλυκερίνη και τη νικοτίνη και το μόνο που άλλαζε ήταν το θεραπευτικό σύστημα. 30' πριν την έναρξη των πειραμάτων το δέρμα αφέθηκε εκτός ψύξης, ώστε να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου και κόπηκε σε τεμάχια διαστάσεων περίπου 1.4 cm x 1.4 cm με την κεράτινη στοιβάδα να προσανατολίζεται προς τα πάνω. Έπειτα, το εκάστοτε διαδερμικό θεραπευτικό σύστημα κόπηκε, με κατάλληλο όργανο, σε τεμάχια που καλύπτουν τη διαθέσιμη επιφάνεια των κυττάρων Franz (μεγαλύτερης από 0,636 cm<sup>2</sup>) και προσκολλήθηκε στο δέρμα. Εν συνεχεία, έγινε στοιβαξη του ιστού στην επιφάνεια του κελιού, με τέτοιο τρόπο ώστε το διαδερμικό έμπλαστρο που είναι προσκολλημένο στην κεράτινη στοιβάδα να προσανατολίζεται προς τον θάλαμο-δότη, και η διάταξη συγκρατήθηκε με μεταλλικό σφιγκτήρα. Παράλληλα, τοποθετήθηκαν πάνω στο διαμέρισμα-δέκτη του κυττάρου Franz κυκλικά τεμάχια της μεμβράνης Strat-M, επιφάνειας που καλύπτει τη διαθέσιμη επιφάνεια των κυττάρων (μεγαλύτερης από 0,636 cm<sup>2</sup>), στα οποία είχε ήδη προσκολληθεί το διαδερμικό θεραπευτικό σύστημα στη γυαλιστερή επιφάνεια. Μετά την τοποθέτηση του θαλάμου-δότη, η όλη διάταξη σταθεροποιήθηκε με την προσαρμογή του μεταλλικού σφιγκτήρα. Για κάθε συνταγή όπου χρησιμοποιήθηκε ως μεμβράνη το δέρμα χρησιμοποιήθηκαν 6 κύτταρα, ενώ για κάθε συνταγή που χρησιμοποιήθηκε ως μεμβράνη η Strat-M™ χρησιμοποιήθηκαν 4 κύτταρα, με σκοπό την μείωση της μεταβλητότητας του ερευνητή. Κάθε κύτταρο πληρώθηκε με διάλυμα υποδοχέα, προθερμασμένο στους 32°C, από το πλευρικό βραχίονα μέσω του οποίου τοποθετήθηκε και ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του περιεχομένου. Η μαγνητική ανάδευση εντός του θαλάμου-δέκτη ήταν σχετικά ήπια για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος επικρατούσαν συνθήκες δεξαμενής (sink conditions) και η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 32 ± 0.5 °C με τη βοήθεια υδατόλουτρου συνδεδεμένου με το σύστημα των κελιών Franz. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, 2, 4, 8, 12 και 24 ωρών, γινόταν πλήρης λήψη του διαλύματος του υποδοχέα. Σε κάθε δειγματοληψία των κυττάρων, γινόταν άμεση αντικατάσταση με ίσο όγκο φρέσκου και προθερμασμένου διαλύματος PBS. Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης, αντίστοιχα, σε διάλυμα υποδοχέα.

#### 1.2.4 In vitro-In vivo συσχέτιση<sup>157</sup>

Για την εγκαθίδρυση in vitro- in vivo συσχέτισης, επιχειρήθηκε η συσχέτιση επιπέδου A. Η συσχέτιση επιπέδου A αποτελεί συσχέτιση «σημείου προς σημείο». Στην περίπτωση αυτή γίνεται συσχέτιση της ποσότητας που απορροφάται in vivo, σε σχέση με την ποσότητα που αποδεσμεύεται in vitro, στα ίδια χρονικά σημεία. Για την πραγματοποίηση συσχέτισης επιπέδου A, θα πρέπει πρώτα τα in vivo πειραματικά δεδομένα συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα, να μετατραπούν σε δεδομένα in vivo απορρόφησης, δηλαδή σε αθροιστικά δεδομένα ποσότητας του φαρμάκου που φθάνει στο αίμα. Το ποσοστό του φαρμάκου που απορροφάται in vivo (% Absorbed in vivo) υπολογίζεται από τα πειραματικά δεδομένα συγκέντρωσης μετά από peros, διαδερμική ή ενδοφλέβια χορήγηση, με τη βοήθεια κάποιων μεθόδων όπως της αποσυνέλιξης.

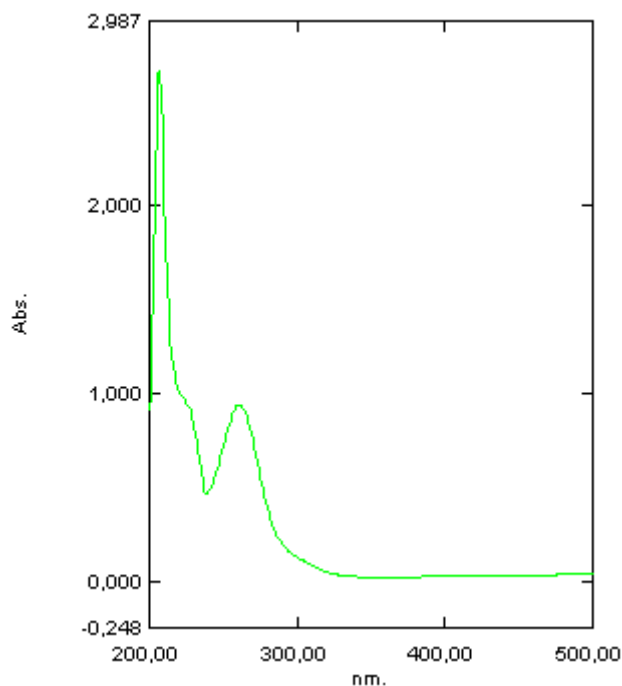
##### 1.2.4.1 Η μέθοδος της αποσυνέλιξης (Deconvolution method)

Η μέθοδος της αποσυνέλιξης χρησιμοποιείται για να αξιολογήσει την in vivo απορρόφηση ενός φαρμάκου όταν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα από τη χορήγηση. Μία πολύ κοινή εφαρμογή της αποσυνέλιξης είναι η αξιολόγηση της απορρόφησης ενός φαρμάκου μετά από χορήγηση από το στόμα. Η μέθοδος της αποσυνέλιξης μπορεί να βρει εφαρμογή και σε άλλες οδούς χορήγησης των φαρμάκων, όπως είναι η διαδερμική χορήγηση. Για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής βρέθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>158,159</sup> για τη βιοδιαθεσιμότητα των φαρμάκων έπειτα από χορήγηση από το δέρμα, όπως και βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>158,160</sup> των επιπέδων στο αίμα έπειτα από χορήγηση IV Bolus. Τα δεδομένα αυτά επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Phoenix<sup>®</sup> WinNonlin<sup>®</sup> Validation Suite<sup>™</sup> 7.0 με σκοπό την αξιολόγηση του προφίλ της απορρόφησης έπειτα από in vivo χορήγηση στο δέρμα. Στη συνέχεια, τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την εγκαθίδρυση in vitro–in vivo συσχετίσεων.

## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1.1 Φάσμα UV

Από το φάσμα υπεριώδους-ορατού βρέθηκε ότι η νικοτίνη απορροφά στα 261nm, όπως προτείνεται και στη βιβλιογραφία, επομένως το μήκος κύματος αυτό επιλέχθηκε για την ανίχνευση της ουσίας σε όλα τα πειράματα.

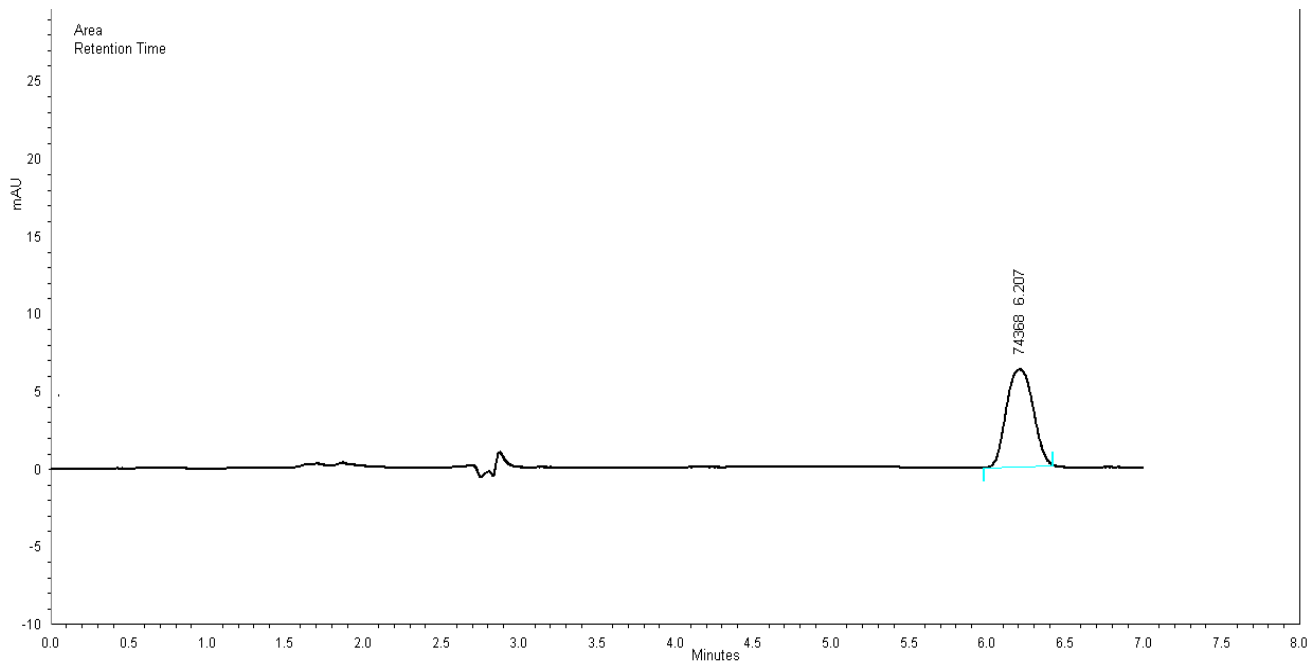


Εικόνα 38: Φάσμα UV πρότυπου διαλύματος νικοτίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος με pH 7,4. Το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη μέγιστη απορρόφηση της ουσίας ( $\lambda_{max}$ ) είναι τα 261 nm.

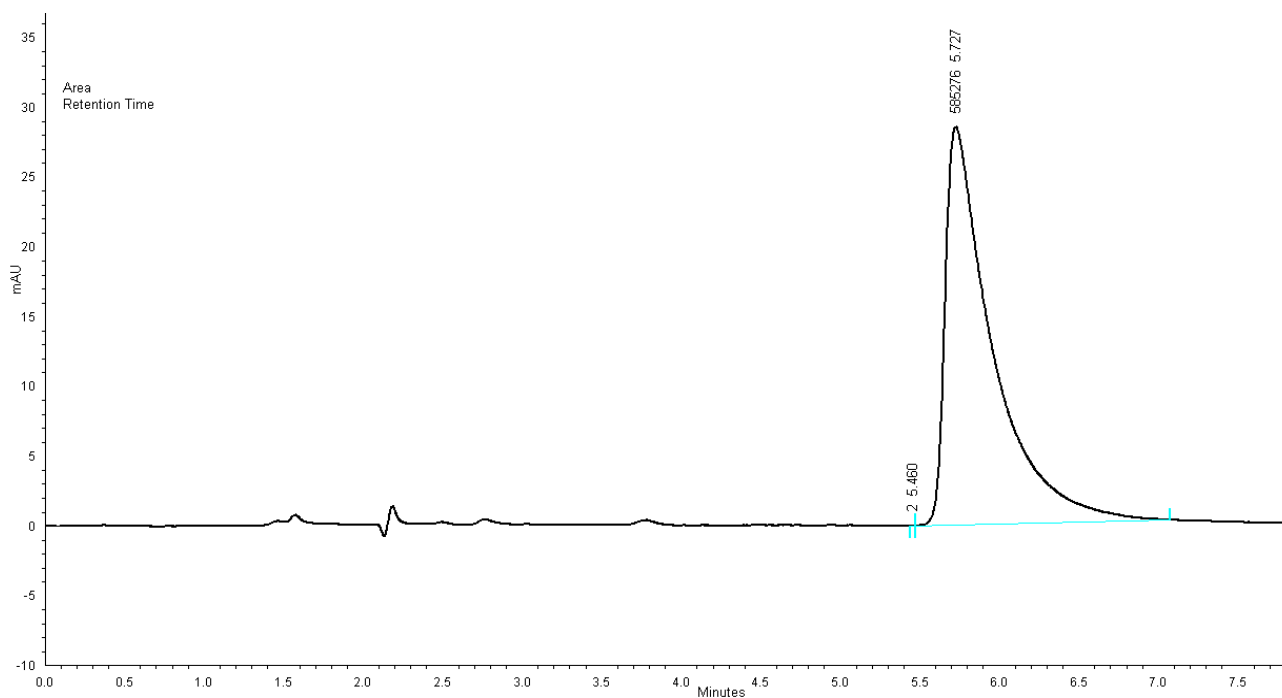
### 1.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

#### 1.2.1 Χρωματογράφημα των υπό εξέταση ουσιών

Στις εικόνες 39 και 40, παρατίθενται χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης, εντός κινητής φάσης, συγκέντρωσης 5μg/ml και 20μg/ml αντίστοιχα. Όπως φαίνεται, ο χρόνος ανάλυσης της νιτρογλυκερίνης είναι 6,2 min και της νικοτίνης είναι 5,7 min.



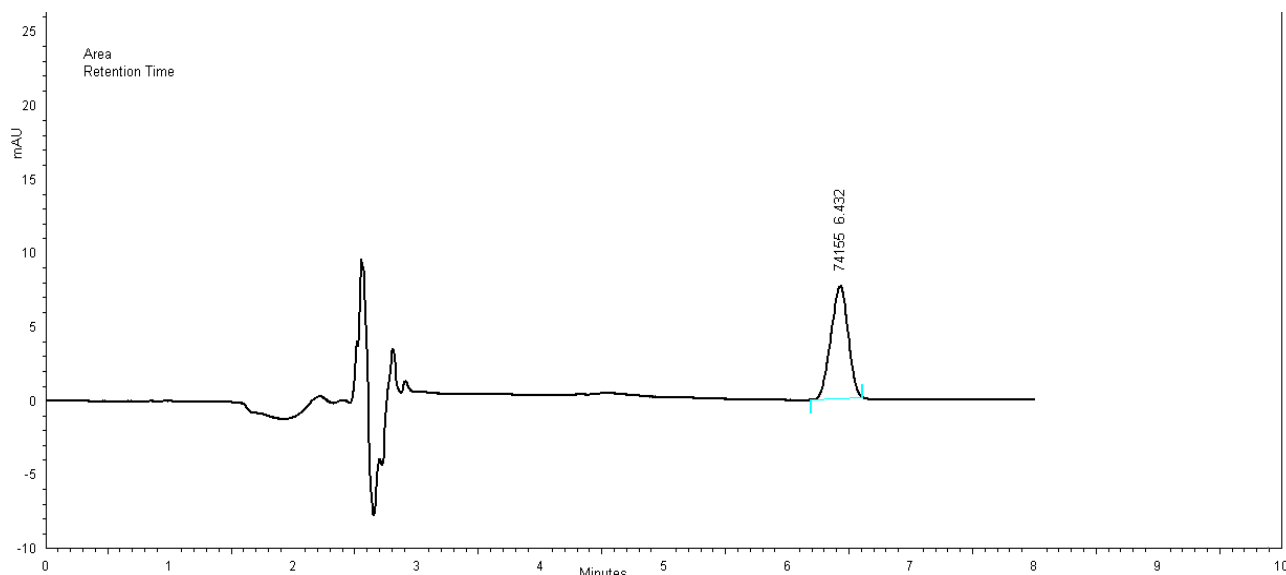
Εικόνα 39: Χρωματογράφημα πρότυπου δείγματος της νιτρογλυκερίνης, μεσαίας συγκέντρωσης, σε κινητή φάση. Ο χρόνος συγκράτησης για τη νιτρογλυκερίνη είναι 6,2 min.



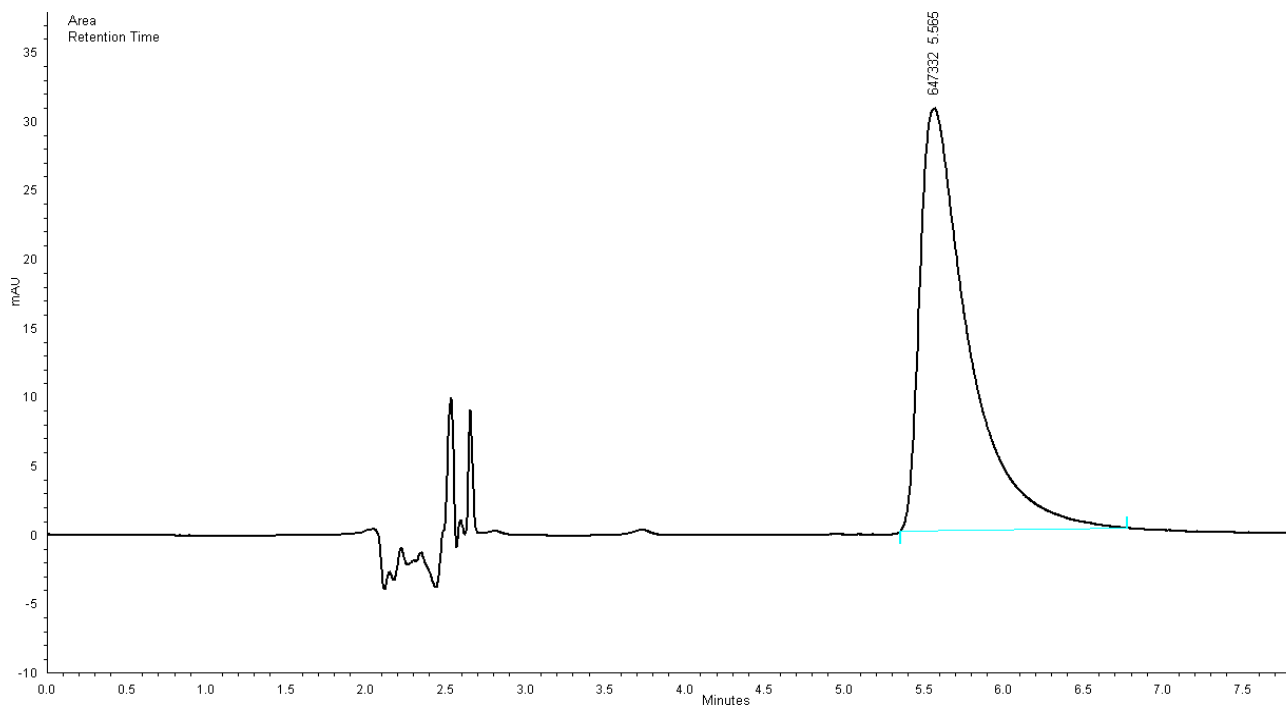
Εικόνα 40: Χρωματογράφημα πρότυπου δείγματος της νικοτίνης, σε μεσαία συγκέντρωση, σε κινητή φάση. Ο χρόνος συγκράτησης για τη νικοτίνη είναι 5,7 min.

### 1.2.2 Έλεγχος πιθανών παρεμποδίσεων στις χρωματογραφικές κορυφές

Χάρη στην ανάλυση πρότυπου διαλύματος νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης, συγκέντρωσης 5μg/ml και 20μg/ml αντίστοιχα, εντός ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος με pH 7,4, φάνηκε ότι η παρουσία του άλατος δεν παρεμποδίζει την εμφάνιση των κορυφών (Εικόνα 41-42).



Εικόνα 41: Χρωματογράφημα νιτρογλυκερίνης εντός διαλύματος υποδοχέα.



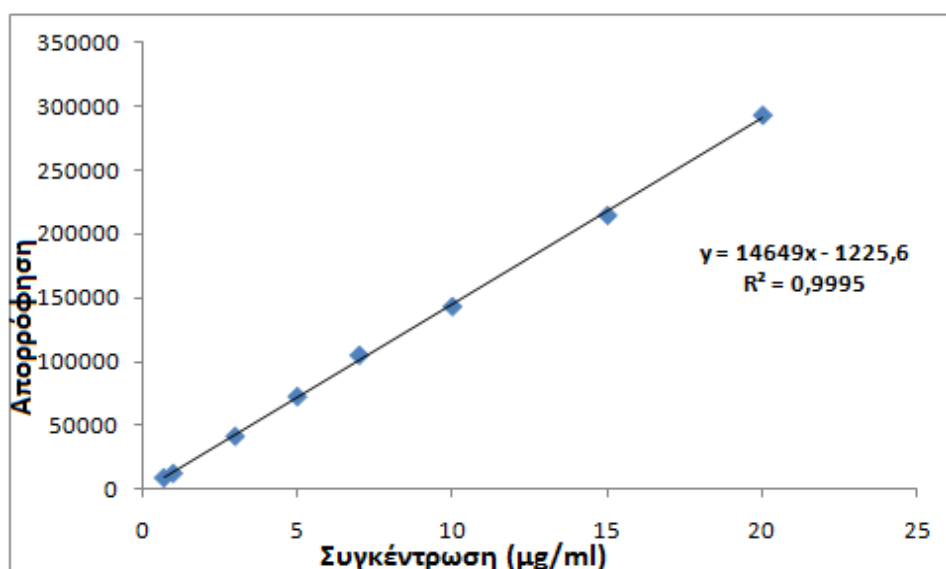
Εικόνα 42: Χρωματογράφημα νικοτίνης εντός διαλύματος υποδοχέα.

### 1.3 Έλεγχος γραμμικότητας της μεθόδου ανάλυσης

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των πρότυπων διαλυμάτων νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης – τα οποία παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα Γ. 1.2.2.3.- χρησιμοποιήθηκαν για να κατασκευαστεί μια καμπύλη αναφοράς με τη σταθμισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των ευθειών τους ( $y=ax+b$ ), η κλίση ( $a$ , slope), η τεταγμένη επί την αρχή ( $b$ , Y-intercept) και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης ( $R^2$ ).

#### 1) Νιτρογλυκερίνη

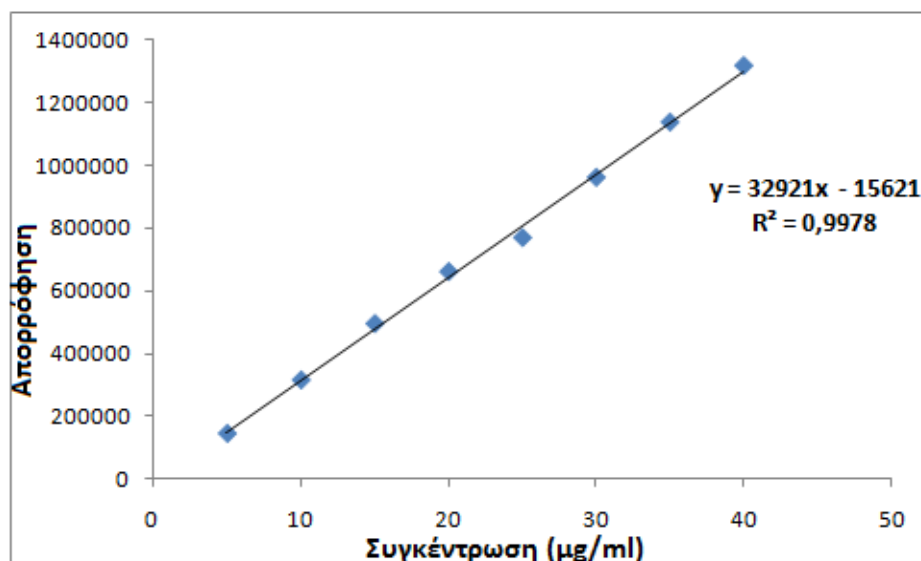
Για τη νιτρογλυκερίνη, η γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης έδειξε ότι η μέθοδος είναι γραμμική σε εύρος συγκεντρώσεων από 0,7 έως 20  $\mu\text{g/ml}$ , εύρος και στο οποίο εργαστήκαμε (Διάγραμμα 1), με συντελεστή συσχέτισης  $R^2$  0,9995.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη αναφοράς προτύπων διαλυμάτων νιτρογλυκερίνης σε κινητή φάση.

#### 2) Νικοτίνη

Για τα πειράματα της νικοτίνης, η γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης έδειξε ότι η μέθοδος είναι γραμμική σε εύρος συγκεντρώσεων από 5  $\mu\text{g/ml}$  έως 40  $\mu\text{g/ml}$ , με συντελεστή συσχέτισης  $R^2$  0,9978.



Διάγραμμα 2: Καμπύλη αναφοράς προτύπων διαλυμάτων νικοτίνης σε κινητή φάση.

#### 1.4 Μελέτες διαλυτότητας

Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος διαδερμικής διαπερατότητας είναι σημαντική η διατήρηση των συνθηκών δεξαμενής (sink conditions), έτσι ώστε η συγκέντρωση της διαχεόμενης ουσίας να μην ξεπερνάει το 10% του κορεσμένου διαλύματος της στον υποδοχέα και η δόση της στην επιφάνεια της μεμβράνης να θεωρείται άπειρη, δηλαδή η συγκέντρωσή της στην φάση του δότη να μην υφίσταται αλλαγές κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Για τον έλεγχο, λοιπόν, των συνθηκών δεξαμενής βρέθηκε βιβλιογραφικά η διαλυτότητα κορεσμού των υπό εξέταση ουσιών. Η διαλυτότητα κορεσμού της νιτρογλυκερίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (pH 7.4) είναι 1,25 mg/ml και, ως εκ τούτου, οι συνθήκες δεξαμενής στο διάλυμα του υποδοχέα διατηρούνται με συγκέντρωση φαρμάκου μικρότερη ή ίση με 125 µg/ml.<sup>85</sup>

Η διαλυτότητα κορεσμού της νικοτίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (pH 7.4) είναι 1000 mg/mL. Επομένως, οι συνθήκες δεξαμενής στα διάλυμα δέκτη διατηρούνται με συγκέντρωση φαρμάκου μικρότερη ή ίση με 10<sup>5</sup>µg/ml.<sup>161</sup>



## 1.5 In vitro μελέτη διαδερμικής διαπερατότητας

### 1)Νιτρογλυκερίνη

Για τη νιτρογλυκερίνη, εξετάστηκε, in vitro, η διαπέραση του εμπορικού προϊόντος Nitrong TTS 5mg/24h σε ανθρώπινο δέρμα (Δότης 25112015) και στην τεχνητή μεμβράνη Strat-M™. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διαπέραση της ουσίας μέσω του δέρματος και της μεμβράνης Strat-M™, χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της in vitro-in vitro συσχέτισης με τη μέθοδο της γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης βάσει της οποίας υπολογίστηκαν η εξίσωση της ευθείας ( $y=ax+b$ ), η κλίση της ( $a$ , slope) και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης ( $R^2$ ). Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα δεδομένα με τη μορφή αθροιστικών ποσοτήτων νιτρογλυκερίνης ανά μονάδα επιφάνειας δέρματος και Strat-M™,  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), όπως και η επί τοις % αποδέσμευση της ουσίας από την αρχική δόση, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις, για τη δειγματοληψία των 2, 4, 8, 12, 24 ωρών.

Time point (hours)	Cumulative amount per unit area, $Q$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	
	Nitrong Skin	Nitrong Strat-M™
2	9,40 ± 2,13	60,17 ± 17,71
4	22,42 ± 3,39	147,66± 37,97
8	55,35 ± 5,72	352,48 ±77,89
12	90,52 ± 7,31	534,91±112,56
24	203,35±15,39	949,87±158,75

Πίνακας 7: Αθροιστική ποσότητα νιτρογλυκερίνης ανά μονάδα επιφάνειας  $Q$  ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) δέρματος και Strat-M™.

Time point (hours)	% Release of Applied Dose	
	Nitrong Skin	Nitrong Strat-M™
2	0,29 ± 0,07	1,88 ± 0,55
4	0,70 ± 0,11	4,61 ± 1,19
8	1,73 ± 0,18	11,02 ± 2,43
12	2,83 ± 0,23	16,72 ± 3,52
24	6,35 ± 0,48	29,69 ± 4,96

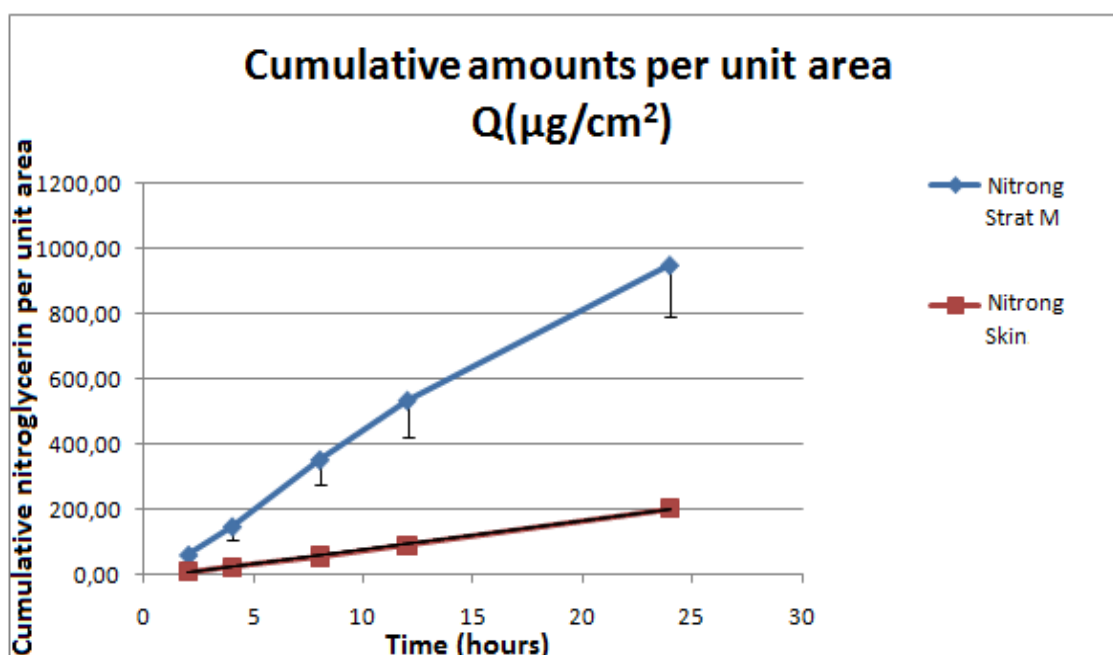
Πίνακας 8: Επί τοις % αποδέσμευση της νιτρογλυκερίνης από την αρχική δόση.

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα διαγράμματα των αθροιστικών ποσοτήτων νιτρογλυκερίνης ανά μονάδα επιφανείας ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) και της % αποδέσμευσής της. Στο διάγραμμα 3 των αθροιστικών ποσοτήτων νιτρογλυκερίνης ανά μονάδα επιφανείας φαίνονται οι καμπύλες που προκύπτουν από τα δεδομένα του δέρματος και της Strat-M™. Σύμφωνα με το διάγραμμα, τα δεδομένα που προκύπτουν από τα πειράματα που έγινε χρήση ανθρώπινου δέρματος και τα πειράματα με τη Strat-M™, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σε όλα τα χρονικά σημεία. Η διαπέραση του φαρμάκου από το δέρμα είναι πιο αργή από τη τεχνητή μεμβράνη Strat-M™ αποδίδοντας έπειτα από 24 ώρες  $203,35 \pm 15,39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  και  $949,87 \pm 158,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  αντίστοιχα.

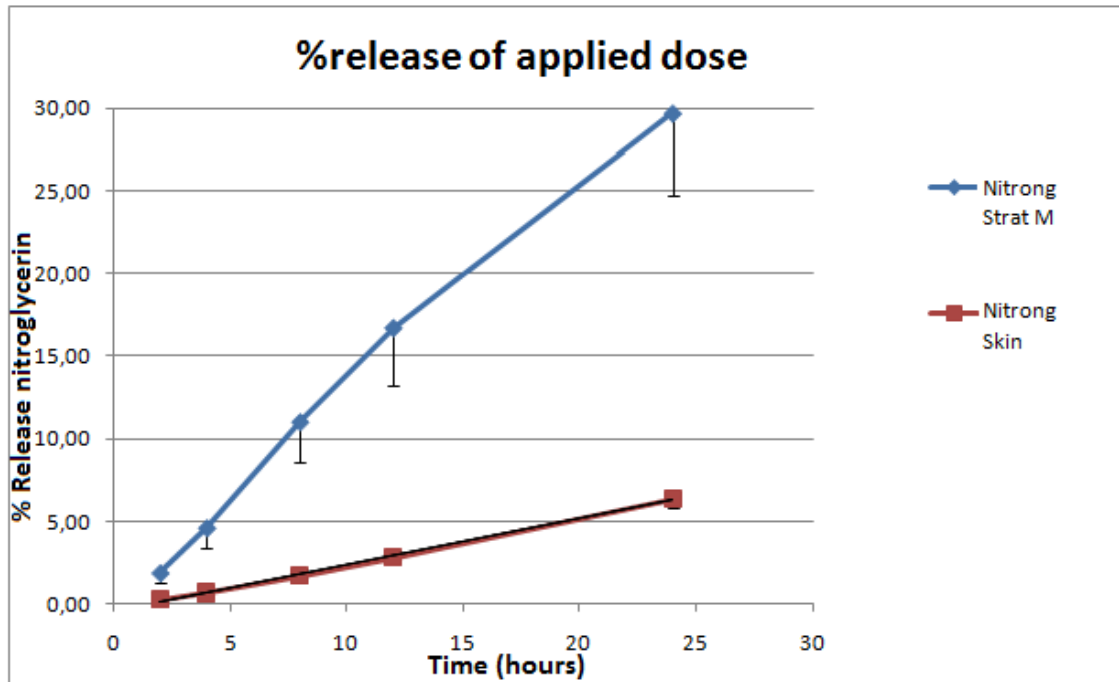
Στον πίνακα 8 και διάγραμμα 4 παρουσιάζεται η επί τοις % αποδέσμευση της δόσης που αρχικά εφαρμόστηκε. Για οποιοδήποτε διαδερμικό θεραπευτικό σύστημα, ο αρχικός βαθμός συγκέντρωσης της φαρμακευτικής ουσίας μεταξύ της δεξαμενής του φαρμάκου και του δέρματος πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος ώστε να διατηρηθεί η παροχή του φαρμάκου καθόλη τη διάρκεια της εφαρμογής. Βέβαια, αυτό προϋποθέτει ότι η ποσότητα της ουσίας στο επίθεμα ξεπερνάει την ποσότητα που αποδεσμεύεται.<sup>73</sup> Σύμφωνα, λοιπόν, με το φύλλο οδηγιών του Nitrong TTS 5mg /24h, κάθε διαδερμικό θεραπευτικό σύστημα  $7 \text{ cm}^2$  περιέχει 22,4 mg νιτρογλυκερίνης και απελευθερώνει στις 24 ώρες 5mg στο αίμα δηλαδή in vivo απελευθερώνεται το 22,32% της αρχικής δόσης. Παρατηρούμε, λοιπόν, ότι τα αποτελέσματα από το

ανθρώπινο δέρμα παρουσιάζουν χαμηλότερα ποσοστά αποδέσμευσης σε αντίθεση με τα αποτελέσματα από τη Strat-M™ που καταδεικνύουν υψηλότερα ποσοστά, 6,35% και 29,69% της αρχικής δόσης αντίστοιχα. Επομένως, βάσει των πειραματικών αποτελεσμάτων, η επί τοις % αποδέσμευση του φαρμάκου in vivo δεν προσεγγίζεται από την in vitro αποδέσμευση του.

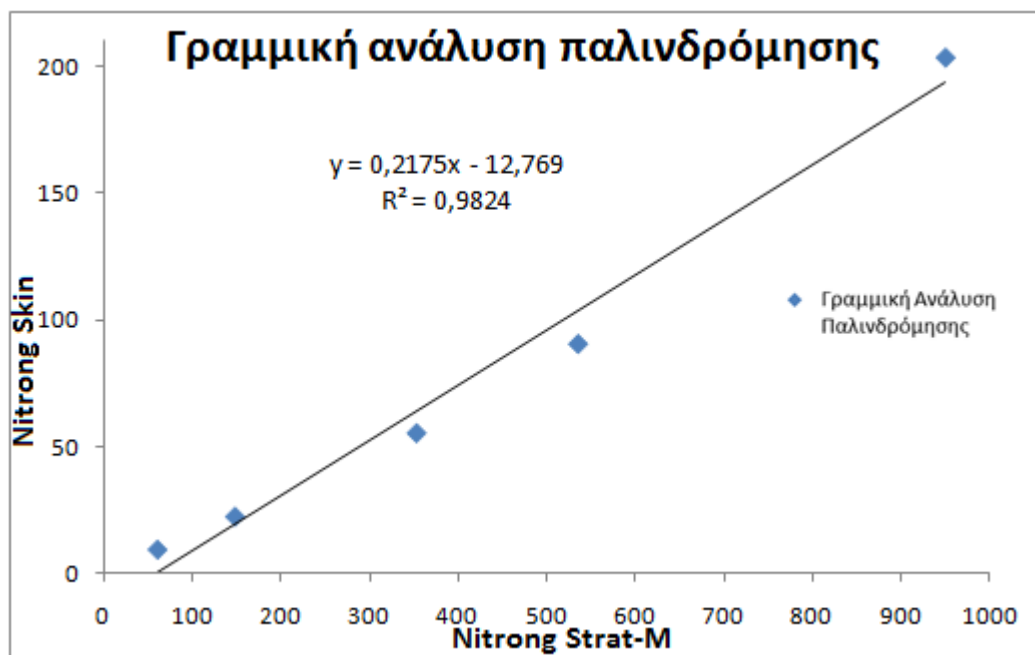
Τέλος, επιχειρήθηκε η γραμμική συσχέτιση της in vitro διαπέρασης της ουσίας μέσω του δέρματος και της Strat-M™ (διάγραμμα 5). Οι συσχετίσεις που προέκυψαν ήταν γραμμικές, με καλούς συντελεστές συσχέτισης  $R^2$ , αποδεικνύοντας, έτσι, ότι τα in vitro πειράματα διαπέρασης του δέρματος και της Strat-M™ ενδεχομένως να έχουν συγκριτικό χαρακτήρα. Συγκεκριμένα, η ευθεία παλινδρόμησης είχε κλίση 0,2175 και συντελεστή συσχέτισης  $R^2$  0,9824.



Διάγραμμα 3: Αθροιστική ποσότητα νιτρογλυκερίνης ανά μονάδα επιφάνειας Q (µg/cm<sup>2</sup>) δέρματος και Strat-M™.



Διάγραμμα 4: Επί τοις % αποδέσμευση της αρχικής δόσης νιτρογλυκερίνης στο δέρμα και στη Strat-M™.



Διάγραμμα 5: Γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης σκευάσματος Nitrong μεταξύ δέρματος και Strat-M™.

## 2) Νικοτίνη

Για τη νικοτίνη, μελετήθηκε, *in vitro*, η διαπέραση του προϊόντος Nicorette clear patch TTS 10MG/16h από τη μεμβράνη Strat-M™ και στη συνέχεια έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της διαπέρασης του ίδιου προϊόντος από το δέρμα (Δότης 17112016). Τα δεδομένα που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της *in vitro-in vitro* συσχέτισης με τη μέθοδο της γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης. Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα δεδομένα με τη μορφή αθροιστικών ποσοτήτων νικοτίνης ανά μονάδα επιφάνειας ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) ενώ παρουσιάζεται και η επί τοις % αποδέσμευση του φαρμάκου από την αρχική δόση μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις, για τις δειγματοληψίες των 2, 4, 8, 12 και 24 ωρών. Όπως και στο πείραμα νιτρογλυκερίνης, οι ρυθμοί και οι ποσότητες που διαπέρασαν τη μεμβράνη είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές του δέρματος.

Time point (hours)	Cumulative amount per unit area, Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	
	Nicorette Skin	Nicorette Strat-M™
2	93,98 ± 2,13	334,52 ± 9,33
4	206,44 ± 3,39	626,07 ± 43,95
8	405,52 ± 5,72	997,74 ± 91,39
12	571,19 ± 7,31	1254,47 ± 89,15
24	918,68±15,39	1587,07±121,47

Πίνακας 9: Αθροιστική ποσότητα νικοτίνης ανά μονάδα επιφάνειας Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) δέρματος και Strat-M™.

Time point (hours)	% Release of Applied Dose	
	Nicorette Skin	Nicorette Strat-M™
2	5,37 ± 2,12	19,12 ± 0,53
4	11,80 ± 3,90	35,78 ± 2,51
8	23,17 ± 6,18	57,01 ± 5,22
12	32,64 ± 7,62	71,68 ± 5,09
24	52,50 ± 9,79	90,69 ± 6,94

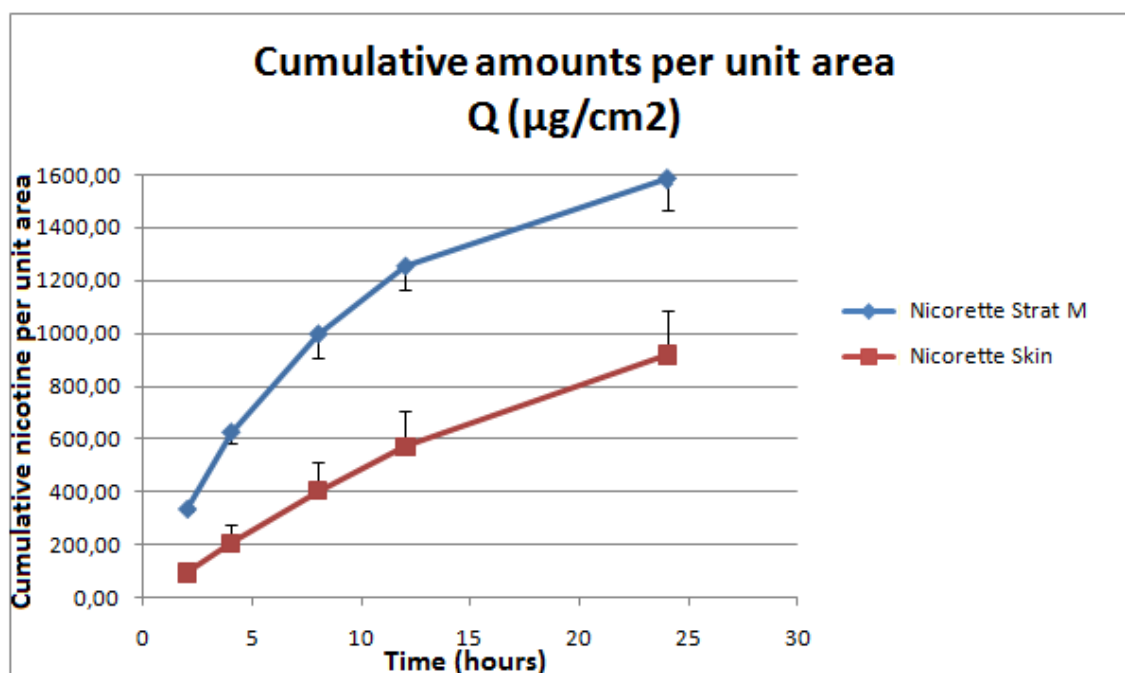
Πίνακας 10: Επί τοις % αποδέσμευση της νικοτίνης από την αρχική δόση.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα διαγράμματα των αθροιστικών ποσοτήτων νιτρογλυκερίνης ανά μονάδα επιφάνειας ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) και της % αποδέσμευσής της. Όπως φαίνεται τόσο από τον πίνακα 9, όσο και από το διάγραμμα 6, η νικοτίνη έχει διαφορετικό προφίλ διαπέρασης στο δέρμα από ότι στη Strat-M™, δεδομένου ότι σε όλα τα χρονικά σημεία των δειγματοληψιών υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, με το προϊόν να διαπερνά με πιο γρήγορο ρυθμό την τεχνητή μεμβράνη. Συγκεκριμένα στις 24 ώρες, η αθροιστική ποσότητα νικοτίνης ανά μονάδα επιφάνειας δέρματος ήταν  $918,68 \pm 15,39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , ενώ η αντίστοιχη ποσότητα ουσίας για τη Strat-M™ ήταν  $1587,07 \pm 121,47 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Κύριο χαρακτηριστικό των πειραματικών δεδομένων αποτελούν τα σχετικά χαμηλά RSDs% που παρατηρούνται τόσο για τη μεμβράνη Strat-M™ όσο και για το δέρμα. Πιο συγκεκριμένα, στις τιμές του δέρματος δεν παρατηρούνται RSD% μεγαλύτερα από 39,42% ενώ στα αντίστοιχα πειράματα της Strat-M™ παρατηρούνται RSD% που φτάνουν το πολύ στο 9,16%, αποδεικνύοντας τη χαμηλή μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την τεχνητή μεμβράνη. Παρόλα αυτά, ακόμα και για το δέρμα, οι τιμές RSD% είναι πολύ χαμηλές.

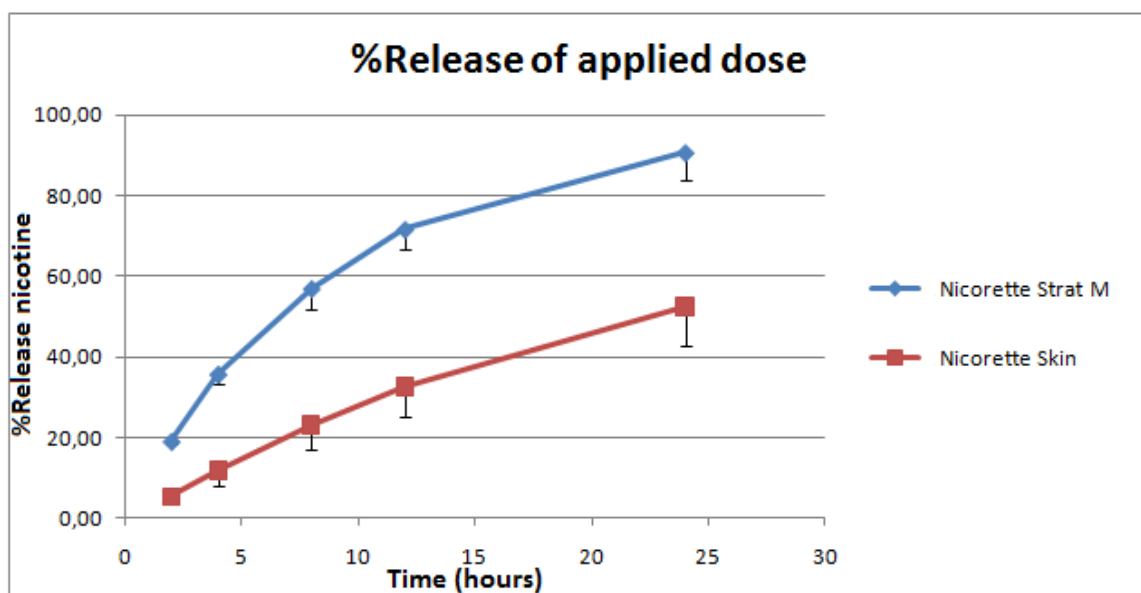
Στον πίνακα 10 και διάγραμμα 7 παρουσιάζεται η επί τοις % αποδέσμευσης της δόσης που αρχικά εφαρμόστηκε. Δεδομένου ότι σε ένα έμπλαστρο επιφάνειας  $9\text{cm}^2$  περιέχονται 15,75 mg νικοτίνης και στις 16hr αποδεσμεύονται 10 mg, η επί τοις %

αποδέσμευση του φαρμάκου in vivo από το έμπλαστρο υπολογίζεται στο 63%. Σε πείραμα 24 ωρών, παρατηρούμε ότι από το δέρμα διαπέρασε περίπου το 52,50% της αρχικής δόσης ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τη Strat-M™ ήταν  $90,69 \pm 6,94$  %, γεγονός που δείχνει ότι η τεχνητή μεμβράνη παρουσιάζει αρκετά υψηλότερα ποσοστά αποδέσμευσης. Επομένως, η επί τοις % αποδέσμευση του φαρμάκου in vivo δεν προσεγγίζεται από την in vitro αποδέσμευση του.

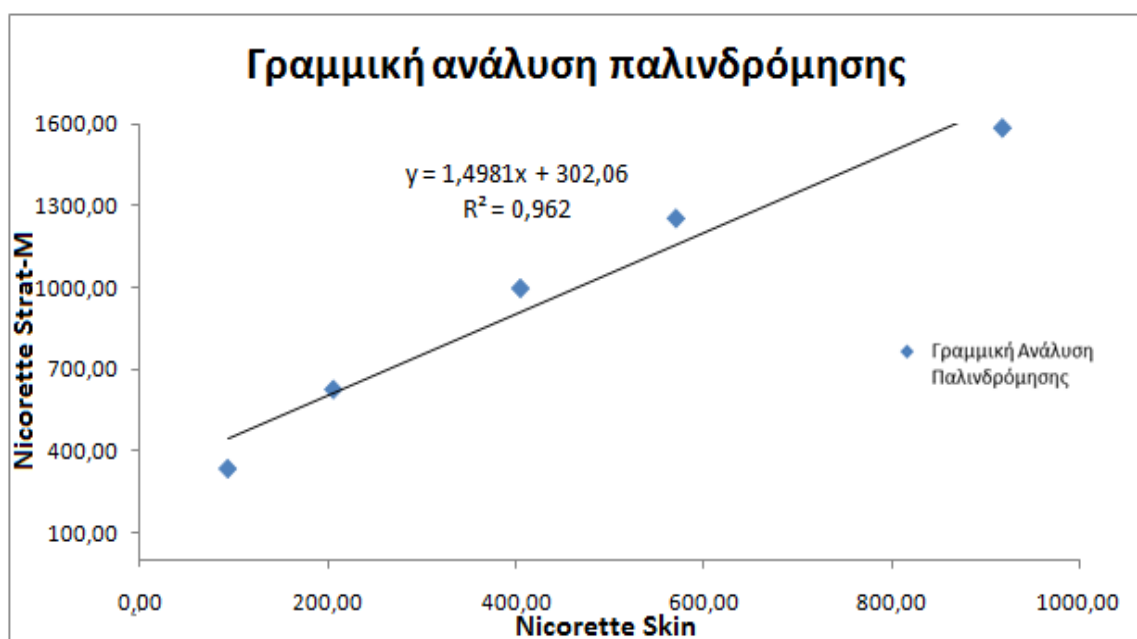
Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η in vitro-in vitro συσχέτιση των αποτελεσμάτων διαπέρασης από το δέρμα και τη μεμβράνη Strat-M™ (διάγραμμα 8). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για το προϊόν υπάρχει γραμμική συσχέτιση των πειραματικών δεδομένων διαπέρασης του δέρματος και της τεχνητής μεμβράνης. Πιο αναλυτικά, προέκυψε ευθεία με κλίση 1,4981 και συντελεστή συσχέτισης  $R^2$  0,962, γεγονός που ενδεχομένως αποκαλύπτει το συγκριτικό χαρακτήρα της μεμβράνης Strat-M™.



Διάγραμμα 6: Αθροιστική ποσότητα νικοτίνης ανά μονάδα επιφάνειας Q ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) δέρματος και Strat-M™.



Διάγραμμα 7: Επί τοις % αποδέσμευση της αρχικής δόσης νικοτίνης στο δέρμα και στη Strat-M™.



Διάγραμμα 8: Γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης σκευάσματος Nicorette μεταξύ δέρματος και Strat-M™.

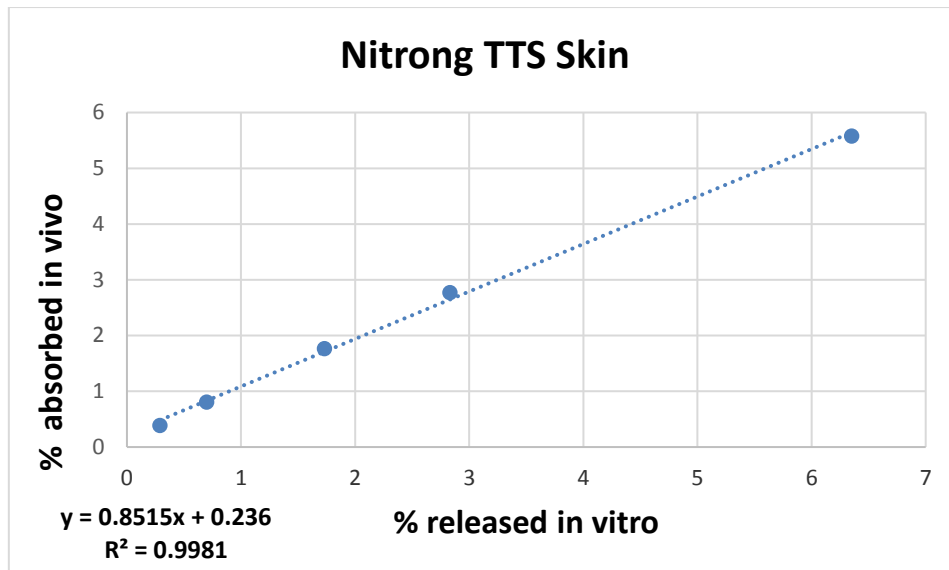


## 1.6 In vitro – In vivo Συσχετίσεις

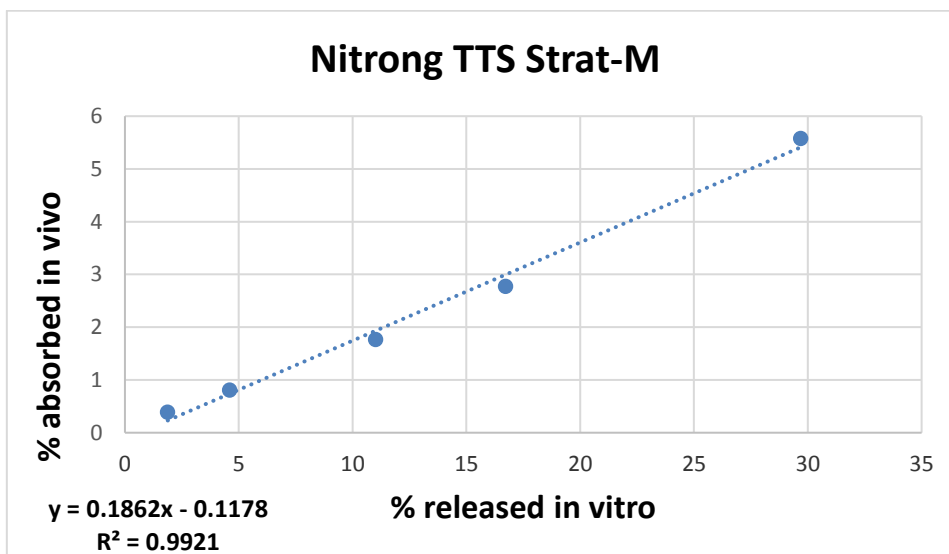
Μετά την επεξεργασία των in vitro αποτελεσμάτων επιχειρήθηκε η εγκαθίδρυση in vitro-in vivo συσχετίσεων, επιπέδου A, για τα αποτελέσματα της διαπέρασης μέσω του δέρματος και της μεμβράνης Strat-M™. Πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας που απορροφάται in vivo, η οποία προέκυψε με τη μέθοδο της αποσυνέλιξης, και της ποσότητας που αποδεσμεύεται in vitro, στα ίδια χρονικά σημεία. Τα αποτελέσματα των συσχετίσεων φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα.

### 1) Νιτρογλυκερίνη

Οι in vitro – in vivo συσχετίσεις που επιχειρήθηκαν για τη νιτρογλυκερίνη αφορούσαν τα in vivo δεδομένα διαδερμικής απορρόφησης με τα in vitro δεδομένα αποδέσμευσης από το Δότη 25112015 και τη μεμβράνη StratM (Διάγραμμα 9 και 10). Και στις 2 περιπτώσεις τα in vitro δεδομένα έδειξαν γραμμική συσχέτιση με τα in vivo, με ικανοποιητικούς συντελεστές συσχέτισης  $R^2$ . Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τη Strat-M, η ευθεία παλινδρόμησης είχε κλίση 0,1862 και συντελεστή συσχέτισης  $R^2$  0,9921, ενώ στην περίπτωση του δέρματος η ευθεία είχε κλίση 0,8515 με συντελεστή συσχέτισης  $R^2$  0,9981. Στην περίπτωση της in vitro διαπέρασης του δέρματος, τα αποτελέσματα φαίνεται να υποεκτιμούν την in vivo απορρόφηση, ενώ στην περίπτωση της Strat-M™ την υπερεκτιμούν. Ωστόσο, δεδομένου ότι σε όλες τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα συνδέονται γραμμικά με ικανοποιητικούς συντελεστές συσχέτισης και λαμβάνοντας υπόψη ότι, τόσο στις in vivo όσο και στις in vitro συνθήκες, το περιοριστικό βήμα για την απορρόφηση ενός φαρμάκου διαμέσου του δέρματος αποτελεί η διαπέραση της κεράτινης στιβάδας, φαίνεται ότι τα in vitro πειράματα είτε με δέρμα είτε με τη μεμβράνη Strat-M™ ενδεχομένως να έχουν προβλεπτικό χαρακτήρα σχετικά με τη συμπεριφορά ενός φαρμάκου in vivo.



Διάγραμμα 9: In vivo-in vitro συσχέτιση του σκευάσματος Nitrong TTS 5mg/24h στη μεμβράνη του ανθρώπινου δέρματος.

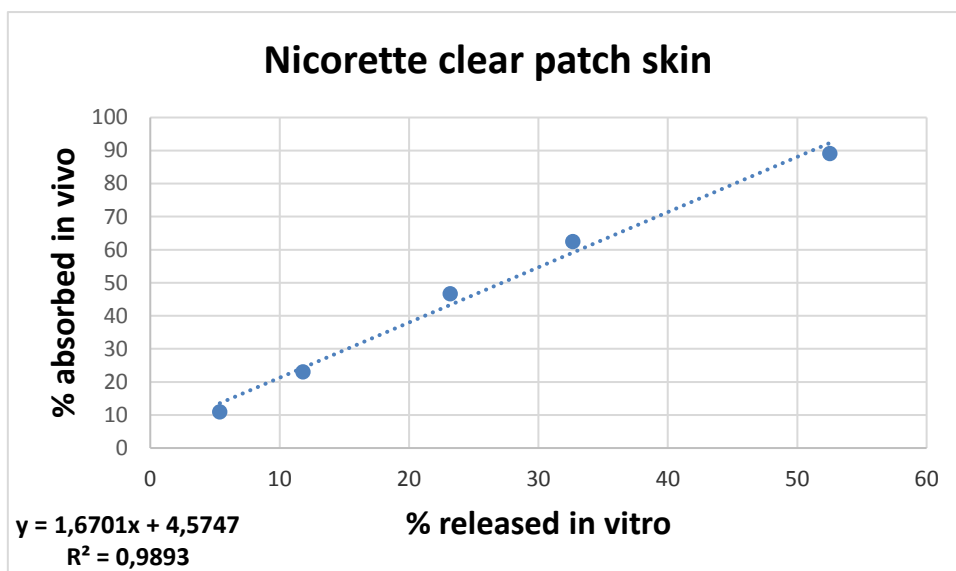


Διάγραμμα 10: In vivo-in vitro συσχέτιση του σκευάσματος Nitrong TTS 5mg /24h στην τεχνητή μεμβράνη Strat-M.

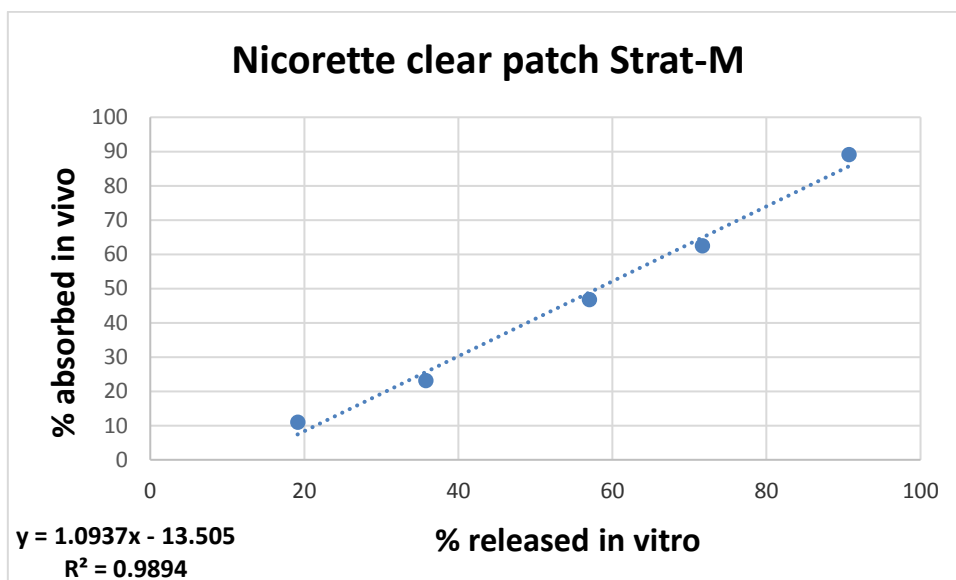
## 2) Νικοτίνη

Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται οι in vitro–in vivo συσχετίσεις για τη νικοτίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν και στις 2 περιπτώσεις ότι το % ποσοστό που αποδεσμεύτηκε in vitro, συνδέεται γραμμικά με το ποσοστό του φαρμάκου που απορροφήθηκε in vivo, με καλούς συντελεστές συσχέτισης  $R^2$ . Συγκεκριμένα, όσον αφορά τη Strat-M, η ευθεία παλινδρόμησης είχε κλίση 1,0937 και συντελεστή συσχέτισης  $R^2$  0,9894, ενώ στην περίπτωση του δέρματος η ευθεία είχε κλίση 1,6701

με συντελεστή συσχέτισης  $R^2$  0,9893. Στην περίπτωση της *in vitro* διαπέρασης του δέρματος, τα αποτελέσματα φαίνεται να υποεκτιμούν την *in vivo* απορρόφηση, ενώ στην περίπτωση της Strat-M™ την υπερεκτιμούν. Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση της νιτρογλυκερίνης, έτσι και για τη νικοτίνη, τα *in vitro* πειράματα είτε με τη χρήση δέρματος, είτε με τη χρήση της μεμβράνης Strat-M™ ενδεχομένως να μπορούν αν δώσουν μια προβλεπτική εικόνα σχετικά με τη συμπεριφορά του φαρμάκου *in vivo*.



Διάγραμμα 11: *In vivo-in vitro* συσχέτιση του σκευάσματος Nicorette clear patch TTS 10mg/16h στη μεμβράνη του ανθρώπινου δέρματος.



Διάγραμμα 12: *In vivo-in vitro* συσχέτιση του σκευάσματος Nicorette clear patch TTS 10mg/16h στην τεχνητή μεμβράνη Strat-M™.

## Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 1.1 Τεχνητή μεμβράνη Strat-M™ στα in vitro πειράματα

- ❖ Η μεμβράνη StratM® είναι ιδιαίτερα εύκολη στο χειρισμό και δεν απαιτεί καμία προεργασία.
- ❖ Παρουσιάζει μικρότερη διακύμανση τιμών διαπερατότητας από κύτταρο σε κύτταρο σε σχέση με το δέρμα για τη νικοτίνη και μεγαλύτερη διακύμανση τιμών για τη νιτρογλυκερίνη.
- ❖ Παρουσιάζει χαμηλή μεταβλητότητα η οποία αποδεικνύεται από τις χαμηλές τιμές RSDs% των πειραματικών δεδομένων. Στην περίπτωση του διαδερμικού θεραπευτικού συστήματος Nicorette clear patch®, τα RSDs% ήταν πολύ μικρότερα από αυτά του δέρματος.
- ❖ Υπερεκτιμά τη διαπερατότητα των διαδερμικών θεραπευτικών προϊόντων της νιτρογλυκερίνης και της νικοτίνης σε σχέση με το δέρμα.
- ❖ Τόσο για το σκεύασμα Nitrong® όσο και για το Nicorette clear patch®, υπάρχει γραμμική συσχέτιση των τιμών  $Q(\mu\text{g}/\text{cm}^2)$  στο δέρμα και στη Strat-M™ με ικανοποιητικούς συντελεστές γραμμικής συσχέτισης  $R^2$ .

### 1.2 Μεμβράνη ανθρώπινου δέρματος στα in vitro πειράματα

- ❖ Τόσο στα πειράματα διαδερμικής διαπέρασης του φαρμάκου Nitrong® όσο και στα πειράματα του φαρμάκου Nicorette Clear patch®, τα in vitro πειράματα δεν προέβλεψαν την ποσότητα του φαρμάκου που αποδεσμεύεται in vivo.
- ❖ Τα πειραματικά δεδομένα του δέρματος παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή μεταβλητότητα η οποία αποδεικνύεται από τις χαμηλές τιμές RSDs% των αθροιστικών ποσοτήτων νιτρογλυκερίνης και νικοτίνης ανά μονάδα επιφανείας δέρματος.

### 1.3 In vitro – in vivo Συσχετίσεις

- ❖ Σε όλες τις in vitro–in vivo συσχετίσεις που προέκυψαν από τα πειράματα της παρούσας εργασίας, τα δεδομένα έδειξαν γραμμική συσχέτιση με ικανοποιητικούς συντελεστές συσχέτισης  $R^2$ . Τόσο στην περίπτωση της νιτρογλυκερίνης όσο και της νικοτίνης, τα αποτελέσματα της in vitro διαπέρασης του δέρματος υποεκτίμησαν την in vivo απορρόφηση, ενώ τα

αντίστοιχα in vitro αποτελέσματα της Strat-M™ την υπερεκτίμησαν. Τα in vitro πειράματα, είτε με δέρμα είτε με τη μεμβράνη Strat-M™, ενδεχομένως να έχουν προβλεπτικό χαρακτήρα σχετικά με τη συμπεριφορά ενός φαρμάκου in vivo και, ως εκ τούτου, να επιτρέπουν την εγκαθίδρυση in vitro-in vivo συσχετίσεων.

## E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wysocki A.B., Skin anatomy, physiology, and pathophysiology, Nurs Clin North Am, vol. 34, pp. 777-797, 1999
2. Baran R., Maibach H.I., Textbook of Cosmetic Dermatology, 4<sup>th</sup> edition, Informa Healthcare, New York, 2010, section 1, chapt.1
3. Αραπάκης Γ.Ι., Κλινική σημειολογία και διαγνωστική, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2006
4. <http://tpe-cremes-hydratantes.jimdo.com/accueil/i-la-peau/>, τελευταία πρόσβαση στις 23/3/2017
5. Schaefer H., Redelmeier T.E., Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption, Switzerland, Basel, 1996
6. Ehrhardt C, Kim KJ., Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models, Springer, New York, 2008, part I, chapt. 1
7. Riviere J.E., Dermal absorption models in toxicology and pharmacology, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006, chapt.1
8. Κατσάμπας Α.Δ., Μαθήματα Δερματολογίας-Αφροδισιολογίας, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2007
9. Καμουτσή Α.Γ., Πόσο συντελεί η Βιταμίνη C και η Βιταμίνη E στη φωτογήρανση, Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Αισθητικής & Κοσμητολογίας, ΤΕΙ Αθήνας, Αθήνα, 2008, σελ. 20
10. Ράλλης Μ., Παπαϊωάννου Γ.Θ., σημειώσεις μαθήματος Προχωρημένη κοσμετολογία, ΜΠΣ Βιομηχανική Φαρμακευτική, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2007
11. Walters K.A., Dermatological and Transdermal Formulations, Marcel Dekker Inc., New York, 2002, chapt. 1
12. Valladeau J., Saeland S., Cutaneous dendritic cells, vol. 17, pp. 273-83, 2005

13. Forslind B., Albano R.E., Skin, Hair, and Nails: Structure and Function, Marcel Dekker Inc, New York, 2004, part I, chapt. 2
14. Τραντζά Σ., In Vitro Μελέτη της Διαπερατότητας της Ριζατριπάνης μέσω της Κεράτινης Στιβάδας της Επιδερμίδας, Μεταπτυχιακή εργασία, ΜΠΣ Βιομηχανική Φαρμακευτική, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2011
15. Rprausnitz M., Melias P., Franz T.J., Schmuth M., Tsai J.C., Kmenon G., Mholleran W., Feingold K.R., Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery, Medical Therapy Section, vol. 19, pp. 2065-2073, 2012
16. Γαλανού Ε., Ηλιού Α., Μαρκαντώνη Μ., Δερματολογία, 1<sup>ος</sup> κύκλος, Ειδικότητα Αισθητικής Τέχνης, Τομέας Αισθητικής-Κομμωτικής, Παιδαγωγικό Ινστιτούτο, Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, Αθήνα, 2001, κεφ. 1
17. Lai-Cheong J.E., McGrath J.A., Structure and function of skin, hair and nails, Medicine, vol. 37, pp. 223-226, 2009
18. O’Rahilly, Basic Human Anatomy A Regional Study of Human Structure, Dartmouth Medical School, 2004, part I, chapt. 4
19. <http://bioximikos.gr/topics/physiology-anatomy/100-anatomia-dermatos>, τελευταία πρόσβαση στις 23/3/2017
20. Zaidi Z., Lanigan, S.W, Dermatology in Clinical Practice, Springer, London, 2010, chapt. 1
21. Elias P.M., Stratum Corneum Defensive Functions: An Integrated View, J Invest Dermatol, vol. 125, pp. 183–200, 2005
22. Zouboulis C.C., Human Skin: An Independent Peripheral Endocrine Organ, Horm Res, vol. 54, pp. 230–242, 2000
23. Skelly J.P., Shach V.P., Maibach H.I., Guy R.H., Wester R.C., Yacobi A., FDA and AAPS report of the Workshop on Principles and Practices of in vitro Percutaneous Penetration Studies: Relevance to Bioavailability and Bioequivalence, Pharmaceutical Research, vol. 4, pp. 265-267, 1987

24. Καραγιάννη Α.Μ., Μελέτη της διαδερμικής χορήγησης αντιυπερτασικών ουσιών σε in vitro πειράματα με χρήση ενισχυτών διαπέρασης, Μεταπτυχιακή εργασία, ΠΜΣ Ιατρική Χημεία-Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Προϊόντων, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 2014
25. Dayan N., Pathways for Skin Penetration, *Cosmetics & Toiletries magazine*, vol. 120, pp. 67-76, 2005
26. Maibach H., Honari G., *Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects*, Academic Press, Amsterdam, Boston, etc., 2014, chapt. 1
27. Pagliara A., Reist M., Geinoz S., Carrupt P.A., Testa B., Evaluation and Prediction of Drug Permeation, *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 51, pp. 1339-1357, 1999
28. Lademann J., Richter H., Schaefer U.F., Blume-Peytavi U., Teichmann A., Otberg N., Sterry W., Hair Follicles—A Long-Term Reservoir for Drug Delivery, *Skin Pharmacol Physiol*, vol. 19, pp. 232–236, 2006
29. Prausnitz M.R., Mitragotri S., Langer R., Current Status and Future Potential of Transdermal Drug Delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, vol.3, pp.115-123, 2004
30. Wester R.C., Maibach H.I., Cutaneous Pharmacokinetics: 10 Steps to Percutaneous Absorption, *Drug Metabolism Review*, vol. 14, pp. 169-205, 1983
31. Βλάχου-Κωνσταντινίδου Μ.Δ., σημειώσεις μαθήματος Φυσική Φαρμακευτική , ΜΠΣ Βιομηχανική Φαρμακευτική, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2015-2016
32. Kanerva L., Elsner P., Wahlberg J.E., Maibach H.I., *Handbook of Occupational Dermatology*, Springer, Germany, 2000, part I, chapt. 5
33. Allen L.V., Popovich N.G., Ansel H.C., *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 9<sup>th</sup> edition, Lippincott Williams&Wilkins, China, 2011, chapt. 11
34. Rycroft R.J.G., *Textbook of Contact Dermatitis*, 3<sup>rd</sup> edition, Springer, Berlin, 2001, chapt. 11



35. Barry B. W., Topical preparations, in *Pharmaceutics: The science of the dosage form design*, Churchill Livingstone, London, 2000
36. <http://www.yourdictionary.com/diffusion>, τελευταία πρόσβαση στις 23/3/2017
37. Jain G., Khar R.K., Ahmad F.J., *Theory and Practice of Physical Pharmacy*, Elsevier, India, 2012, chapt. 10
38. Steffansen B., Brodin B., Nielse C.U, *Molecular Biopharmaceutics Aspects of drug characterization, drug delivery and dosage form evaluation*, Pharmaceutical Press, London, 2010, part III, chapt. 3.2
39. Παλούρα Ε., σημειώσεις μαθήματος *Τεχνολογία Λεπτών Υμενίων και Εφαρμογες*, ΠΜΣ Φυσική & Τεχνολογία Υλικών, Τμήμα Φυσικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, 2014
40. Δέρβος Κ., Παναγιώτα Β., σημειώσεις μαθήματος *Εισαγωγή στα Υλικά*, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Αθήνα, 2009
41. <http://www.slideshare.net/arijabuhaniyeh/diffusion-physical-pharmacy>, τελευταία πρόσβαση στις 23/3/2017
42. Τσαντίλη-Κακουλίδου Α., σημειώσεις μαθήματος *Προχωρημένη Φαρμακοχημεία Ι*, ΜΠΣ Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Νέων Φαρμακευτικών Ενώσεων, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2013
43. Thong H.Y., Zhai H., Maibach H.I., *Percutaneous Penetration Enhancers: An Overview*, *Skin Pharmacol Physiol*, vol. 20, pp. 272–282, 2007
44. Brown M.B., *Dermal and Transdermal Drug Delivery Systems: Current and Future Prospects*, *Drug Delivery*, vol. 13, pp. 175–187, 2006
45. σημειώσεις εργαστηριακών ασκήσεων *Στερεές από του στόματος χορηγούμενες φαρμακοτεχνικές μορφές*, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2013

46. Δάλλας Π., σημειώσεις μαθήματος Προχωρημένη Φαρμακευτική Τεχνολογία, ΜΠΣ Βιομηχανική Φαρμακευτική, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2015-2016
47. Ueda C.T., Shah V.P., Derdzinski K., Ewing G., Flynn G., Maibach H., Marques M., Rytting H., Shaw S., Thakker K., Yacobi A., Topical and Transdermal Drug Products, Pharmacopeia Forum, vol. 35, pp. 750-764, 2009
48. Rein H., Experimental electroendosmotic studies on living human skin, Z. Biol. vol. 81, pp. 124–128, 1924
49. Μαυρίδου Α., Παράγοντες Ενυδάτωσης στα Καλλυντικά Προϊόντα, Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Αισθητικής και Κοσμετολογίας, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας & Πρόνοιας, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, 2014
50. Scheuplein R.J., Mechanism of percutaneous absorption. I. Routes of penetration and the influence of solubility, J. Invest. Dermatol., vol. 45, pp. 334–345, 1965
51. Scheuplein R.J., Blank I.H., Permeability of the skin A Review of Major Concepts and Some New Developments, Physiol. Rev., vol. 61, pp. 672-676. 1976
52. Michaels A.S., Chandrasekaran S.K., Shaw J.E., Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement, AIChE J., vol. 21, pp. 985–996, 1975
53. Ghosh T.K., Pfister W.R., Yum S.I., Transdermal and topical drug delivery systems, Interpharm Press Inc, Illinois, USA, 1997
54. [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/search\\_product.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/search_product.cfm), τελευταία πρόσβαση στις 23/3/2017
55. Karim A., Transdermal Absorption: A Unique Opportunity for Constant Delivery of Nitroglycerin, Drug Development and Industrial Pharmacy, vol.9, pp. 671-689, 1983
56. Friend D.R., Transdermal delivery of contraceptives, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, vol. 7, pp. 149-86, 1990

57. Prausnitz M.P., Langer R., Transdermal drug delivery, *Nat Biotechnol*, vol. 26, pp. 1261–1268, 2008
58. Schafer-Korting M., *Handbook of Experimental Pharmacology*, Volume 167, Springer, Berlin, Germany, 2010, , part III, chapt. 2
59. Tanwar H., Sachdeva R., Transdermal drug delivery system: A review, *IJPSR*, vol.7, pp. 2274-90, 2016
60. Φράγκου Ε., Τοπική και διαδερμική χορήγηση φαρμάκου με νέα φαρμακοτεχνικά συστήματα, *Ελληνική Δερματοχειρουργική*, τόμος 4, σελ. 41-53, 2007
61. Rani S, Saroha K., Syan N., Mathur P., Transdermal Patches a successful tool in Transdermal Drug Delivery System: An overview, *Der Pharmacia Sinica*, vol. 2, pp. 17-29, 2011
62. Alexander A., Dwivedi S., Ajazuddin, Giri T.K., Saraf S., Tripathi D.K., Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery, *Journal of Controlled Release*, vol. 164, pp. 26–40, 2012
63. Savoji H., Mehdizadeh A., Abadi A.R.S., Transdermal Nitroglycerin Delivery Using Acrylic Matrices: Design, Formulation, and In Vitro Characterization, *ISRN Pharmaceutics*, pp. 1-9, 2014
64. Dhiman S., Singh T.G., Rehni A.K., Transdermal patches: a recent approach to new drug delivery system, *Int J Pharm Pharm Sci*, vol. 3, pp. 26-34, 2011
65. Patel D., Chaudhary S.A., Parmar B., Bhura N., Transdermal Drug Delivery System: A Review, *The Pharma Innovation*, vol. 1, pp. 66-75, 2012
66. Hughes P.J., Freeman M.K., Wensel T.M., Appropriate use of transdermal drug delivery systems, *Journal of Nursing Education and Practice*, vol. 3, pp. 129-138, 2013
67. Prabhakar D., Sreekanth J., Jayaveera K.N., Transdermal Drug Delivery Patches: A Review, *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, vol. 3, pp. 213-221, 2013

68. Suryakumari C., Anusha A., Anitha P., Developing for Transdermal Drug Delivery Systems Advance Technologies on a Review, WJPPS, vol. 3, pp. 342-358, 2014
69. <http://www.pharmatutor.org/articles/development-evaluation-transdermal-drug-delivery?page=2>, τελευταία πρόσβαση στις 23/3/2017
70. Mali A.D., Bathe R., Patil M., An updated review on transdermal drug delivery systems, IJASR, vol. 1, pp. 244-254, 2015
71. Jalwal P., Jangra A., Dahiya L., Sangwan Y., Saroha R., A Review On Transdermal Patches, T. Ph. Res., vol. 3, pp. 139-149, 2010
72. Palmer K.J., Buckley M.M., Faulds D., Transdermal Nicotine, A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy as an Aid to Smoking Cessation, Drugs, vol. 44, pp 498–529, 1992
73. Ruela A.L.M., Figueiredo E.C., Perissinato A.G., Lima A.C.Z., Araújo M.B., Pereira G.R., In vitro evaluation of transdermal nicotine delivery systems commercially available in Brazil, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 49, pp. 549-588, 2013
74. Ravi S., Sharma P. K., Bansal M., Transdermal drug delivery of Nicotine, Int. J. Drug Dev.& Res., vol. 3, pp. 1-8, 2011
75. [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_nicotine.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_nicotine.htm), τελευταία πρόσβαση στις 23/3/2017
76. Olivier JC., Rabouan S., Couet W., In vitro comparative studies of two marketed transdermal nicotine delivery systems: Nicopatch and Nicorette, International Journal of Pharmaceutics , vol. 252, pp. 133–140, 2003
77. Davaran S., Rashidi M.R., Khandaghi R., Hashemi M., Development of a novel prolonged-release nicotine transdermal patch, Pharmacological Research, vol. 51, pp. 233–237, 2005
78. Shahab L., Brose L.S., West R., Novel Delivery Systems for Nicotine Replacement Therapy as an Aid to Smoking Cessation and for Harm Reduction:

Rationale, and Evidence for Advantages over Existing Systems, *CNS Drugs*, vol. 27, pp. 1007–1019, 2013

79. Chien Y.W., Keshary P.R., Huang Y.C., Sarpotdar P.P., Comparative Controlled Skin Permeation of Nitroglycerin from Marketed Transdermal Delivery Systems, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 72., pp.968-970, 1983

80. Chien Y.W., Heart A., Pharmaceutical considerations of transdermal nitroglycerin delivery: The various approaches, *Journal*, vol. 108, pp. 207-216, 1984

81. Κοντογιάννη Π., Διαδερμικά συστήματα, εργασία, Βοηθεί Φαρμακείου, ΕΠΑΣ Ιλίου, Ίλιον, 2013-2014

82. Santoro A., Rovati L.C., Setnikar I., Caplain H., Gualano V., Bioavailability and Pharmacokinetic Profile of Glyceryl Trinitrate and of Glyceryl Dinitrates during Application of a New Glyceryl Trinitrate Transdermal Patch, *Drug Res.*, vol. 50, pp.779-785, 2000

83. Guy R.H., Hadgraft J., Transdermal Drug Delivery: A Perspective, *Journal of Controlled Release*, vol. 4, pp. 237-251, 1987

84. Hashimoto S., Kobayashi A., Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Glyceryl Trinitrate and its Metabolites, *Clin Pharmacokinet*, vol. 42, pp. 205-221, 2003

85. [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_nitroglycerin.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_nitroglycerin.htm), τελευταία πρόσβαση στις 23/3/2017

86. Good W.R., Transderm-Nitro Controlled Delivery of Nitroglycerin via the Transderma Route, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 9, pp. 647-670, 1983

87. Goh JY., Weaver R.J., Dixon L., Platt N.J., Roberts R.A., Development and use of in vitro alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980–2013, *Toxicol. Res.*, vol. 4, pp. 1297–1307, 2015

88. Howes D., Guy R., Hadgraft J., Heylings J., Hoeck U., Kemper F., Maibach H., Marty JP., Merk H., Parra J., Rekkas D., Rondelli I., Schaefer H., Täuber U., Verbiese

N., Methods for Assessing Percutaneous Absorption, ATLA, vol. 24, pp. 81-106, 1996

89. Wu S.T., Shiu G.K., Simmons J.E., Bronaugh R.L., Skelly J.P., In Vitro Release of Nitroglycerin from Topical Products by Use of Artificial Membranes, Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 81, pp. 1153-1156, 1992

90. Castell J.V., Gomez-Lechon M.J., In vitro methods in pharmaceutical research, Academic Press, London, 1997, part I, chapt. 1

91. Moss G.P., Gullick D.R., Wilkinson S.C., Predictive Methods in Percutaneous Absorption, Springer, Berlin, 2015, chapt. 2

92. Csizmazia E., Drug permeation study through biological membrane barriers, Ph.D. Thesis, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Szeged, 2011

93. Gummer C.L., Hinz R.S., Maibach H.I., The skin penetration cell: a design update, International Journal of Pharmaceutics, vol. 40, pp. 101-104, 1987

94. Ντομένου Β.Π., Διαδερμική χορήγηση φαρμάκων: Ι] Σύγκριση διαφόρων τύπων ελαστικών λιποσωμάτων και μελέτη μηχανισμού αύξησης διαπερατότητας υδατοδιαλυτών φαρμάκων με τη χρήση τους. ΙΙ] Αύξηση διαπερατότητας αντιυπερτασικών φαρμάκων με συστήματα ενισχυτών διαπέρασης, διδακτωρική διατριβή, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, 2012

95. Franz T.J., Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data, Invest Dermatol., vol. 64, pp. 190-195, 1975

96. Zorin S., Kuylenstierna F., Thulin H., In Vitro Test of Nicotine's Permeability through Human Skin. Risk Evaluation and Safety Aspects, Ann. occup. Hyg., vol. 43, pp. 405-413, 1999

97. <http://www.permeagear.de/vertical.htm>, τελευταία πρόσβαση στις 24/3/2017

98. Δέδε Α., Κιορπελίδη Ε., Παρασκευή και In Vitro Αξιολόγηση Γαληνικών Κρεμών Λιδοκαΐνης – Πριλοκαΐνης, Πτυχιακή Εργασία, Τομέας Φαρμακευτικής

Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2015

99. Patel P., Schmieder S., Krishnamurthy K., Research Techniques Made Simple: Drug Delivery Techniques, Part 2: Commonly Used Techniques to Assess Topical Drug Bioavailability, *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 136, pp. 43-49, 2016

100. Shah V.P., Maibach H.I., Jenner J., Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration, 2<sup>nd</sup> edition, Springer, New York, 2014, chapt. 5

101. Gaddam P., Muthuprasanna P., Suriyaprabha K., Manojkumar J., Rao B.B., Jukanti R., Diffusion cells for measuring skin permeation in vitro, *MSAIJ*, vol. 5, pp. 277-287, 2009

102. Sollfhweland D., Barry B.W., Penetration enhancers for human skin: mode of action of 2-pyrrolidone and dimethylformamide on partition and diffusion of model compounds water, n-alcohols, and caffeine, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 80, pp. 507-514, 1983

103. Friend D.R., In vitro skin permeation techniques, vol. 18, pp. 235–248, 1992

104. Bronaugh R.L., Stewart R.F., Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow-through diffusion cell., *J Pharm Sci.*, vol. 74, pp. 64-67, 1985

105. Addicks W.J., Flynn G.L., Weiner N., Validation of a flow-through diffusion cell for use in transdermal research., *Pharm Res.*, vol. 4, pp. 337-341, 1987

106. Fotaki, N., Flow-through cell apparatus (USP apparatus 4): Operation and features., *Dissolution Technologies*, vol. 18, pp. 46-49, 2011

107. Escobar-Chávez J.J., Merino-Sanjuán V., López-Cervantes M., Urban-Morlan Z., Piñón-Segundo E., Quintanar-Guerrero D., Ganem-Quintanar A., The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin, *J Pharm Pharmaceut Sci*, vol. 11, pp. 104-130, 2008

108. Lademann J., Jacobi U., Surber C., Weigmann H.J., Fluhr J.W., The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 72, pp. 317–323, 2009

109. Moser K., Kriwet K., Naik A., Kalia Y.N., Guy R.H., Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro, *Eur J Pharm Biopharm.*, vol. 52, pp. 103-12, 2001
110. Incecayir T., Agabeyoglu I., Dericci U., Sindel S., Assessment of topical bioequivalence using dermal microdialysis and tape stripping methods, *Pharm Res.*, vol. 28, pp. 2165-2175, 2011
111. Marttin E., Neelissen-Subnel M.T., De Haan F.H., Boddé H.E., A critical comparison of methods to quantify stratum corneum removed by tape stripping, *Skin Pharmacol.*, vol. 9, pp. 69-77, 1996
112. Müller M., *Microdialysis in Drug Development*, AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series, Springer, New York, 2013, part II, chapt. 7
113. Amini H., *Application of Microdialysis in Neurosciences*, Laboratory of Bioanalysis and microdialysis, Department of Pharmacology, Neuroscience Research Center, Golestan University of Medical Sciences
114. Abrahamsso P., *Methodological aspects on microdialysis sampling and measurements*, dissertation, Department of Surgical and Perioperative Sciences Anesthesiology and Intensive Care, Umeå University, Umeå, Sweden, 2010
115. Chefer V.I., Thompson A.C., Zapata A., Shippenberg T.S., Overview of Brain Microdialysis, *Curr Protoc Neurosci.*, chapt. 7, Unit7.1, 2009
116. Bello D., Smith T.J., Woskie S.R., Streicher R.P., Boeniger M.F., Redlich C.A., Liu Y., An FTIR investigation of isocyanate skin absorption using in vitro guinea pig skin, *J Environ Monit.*, vol. 8, pp.523-529, 2006
117. Walters K.A., *Dermatological and Transdermal Formulations*, Marcel Dekker, New York, 2002, chapt. 5
118. Yokomizo Y., Effect of phosphatidylcholine on the percutaneous penetration of drugs through the dorsal skin of guinea pigs in vitro; and analysis of the molecular mechanism, using attenuated total reflectance-fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, *Journal of Controlled Release*, vol. 42, pp. 249–262, 1996



119. Kansy M., Senner F., Gubernator K., Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeability assay in the description of passive absorption process, *J. Med. Chem.*, vol. 41, pp. 1007–1010, 1998
120. Karadzovska D., Riviere J.E., Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane Assays, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 50, pp. 569–576, 2013
121. Ottaviani G., Martel S., Carrupt PA., Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: A New Membrane for the Fast Prediction of Passive Human Skin Permeability, *J. Med. Chem.*, vol. 49, pp. 3948-3954, 2006
122. Vizserálek G., Berkó S., Tóth G., Balogh R., Budai-Szűcs M., Csányi E., Sinkó B., Takács-Novák K., Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method, *Eur J Pharm Sci.*, vol. 30, pp.165-172, 2015
123. Markovic B.D., Vladimirov S.M., Cudina O.A., Odovic J.V., Karljickovic-Rajic K.D., A PAMPA Assay as Fast Predictive Model of Passive Human Skin Permeability of New Synthesized Corticosteroid C-21 Esters, *Molecules*, vol. 17, pp. 480-491, 2012
124. Εφεντάκης Μ.Ι., Φαρμακευτική τεχνολογία των στερεών μορφών, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2008, σελ. 80,81,83
125. Marques M., Topical and Transdermal Drug Products—Product Performance Tests, *Pharmacopeial Forum*, vol. 35, pp. 1-12, 2009
126. Gaikwad A.K., Transdermal drug delivery system: Formulation aspects and evaluation, *Compr. J. Pharm. Sci.*, vol. 1, pp. 1-10, 2013
127. [http://www.powershow.com/view/3d5d41MGU5O/Design\\_and\\_Calibration\\_of\\_a\\_Dissolution\\_Test\\_Equipment\\_Training\\_Workshop\\_on\\_Dissolution\\_Pharmaceutical\\_Product\\_Interchangeability\\_and\\_Biopharmaceutical\\_Classification\\_System\\_Kyiv\\_Ukraine\\_June\\_25\\_-\\_27\\_2007\\_powerpoint\\_ppt\\_presentation](http://www.powershow.com/view/3d5d41MGU5O/Design_and_Calibration_of_a_Dissolution_Test_Equipment_Training_Workshop_on_Dissolution_Pharmaceutical_Product_Interchangeability_and_Biopharmaceutical_Classification_System_Kyiv_Ukraine_June_25_-_27_2007_powerpoint_ppt_presentation), τελευταία πρόσβαση στις 26/3/2017

128. [http://www.authorstream.com/Presentation/mpy33-1288014-dissolution apparatus/](http://www.authorstream.com/Presentation/mpy33-1288014-dissolution-apparatus/), τελευταία πρόσβαση στις 26/3/2017
129. <http://www.slideshare.net/bharathpharmacist/m-pharm-dissolution-39635946>, τελευταία πρόσβαση στις 26/3/2017
130. Zhou M.X., Shoudt D., Calderon G., Feng M., Application of USP Apparatus 7 to In Vitro Drug Release in Scopolamine Transdermal Systems, *Dissolution Technologies*, vol. 14, pp. 25-29, 2007
131. Schmook F.P., Meingassner J.G., Billich A., Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption, *Int J Pharm.*, vol. 215, pp. 51-56, 2001
132. Miki R., Kimura S., Ueda H., Shimamura T., Numajiri S., Seki T., Juni K., Kitano H., Morimoto Y., Suitability of Synthetic Copolymer Membranes as a Human Skin Alternative for In Vitro Skin Permeation Testing, *AATEX*, vol. 15, pp. 14-27, 2010
133. Abd E., Yousef S.A., Pastore M.N., Telaprolu K., Mohammed Y.H., Namjoshi S., Grice J.E., M.S., Skin models for the testing of transdermal drugs, *Clin Pharmacol*, vol. 8, pp. 163–176, 2016
134. Jaroszeski M.J., Heller R., Gilbert R., *Methods in Molecular Medicine, Electrochemotherapy, Electrogenetherapy, and Transdermal Drug Delivery., Electrically Mediated Delivery of Molecules to Cells*, Humana Press, Totowa, NJ, 2000, chapt. 30
135. Kligman A.M., Christophers E., Preparation of isolated sheets of human stratum corneum, *Archives of Dermatology*, vol. 88, pp. 702-705, 1963
136. Bronaugh R.L., Stewart R.F., Simon M., Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies VII: Use of Excised Human Skin, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 75, pp. 1094-1097, 1986
137. Joshi V., Brewster D., Colonero P., In Vitro Diffusion Studies in Transdermal Research: A Synthetic Membrane Model in Place of Human Skin, *Drug Development & Delivery*, vol. 12, pp. 40-42, 2012

138. Wood S.G., Ford G., Leech H., McEwen A., Comparative In-Vitro Dermal Penetration Studies With [14C]-Aniline Using StraT-M Membrane and Dermatomed Human Skin, 10<sup>th</sup> International ISSX Meeting, Drug Metabolism Reviews, vol. 45, 2014
139. van de Sandt J.J.M., van Burgsteden J.A., Cage S., Carmichael P.L., Dick I., Kenyon S., Korinth G., Larese F., Limasset J.C., Maas W.J.M., Montomoli L., Nielsen J.B., Payan JP., Robinson E., Sartorelli P., Schaller K.H., Wilkinson S.C., Williams F.M., In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study, Regulatory Toxicology and Pharmacology, vol. 39, pp. 271–281, 2004
140. Haigh J.M., Smith E.W., The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments, European Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 2, pp. 311–330, 1994
141. Waters L.J., Recent developments in skin mimic systems to predict transdermal permeation, Current Pharmaceutical Design, vol. 21, pp. 2725-2732, 2015
142. Pongjanyakul T., Prakongpan S., Panomsuk S., Puttipipatkachorn S., Priprem A., Shed king cobra and cobra skins as model membranes for in-vitro nicotine permeation studies, Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 54, pp.1345–1350, 2002
143. Ansari M., Kazemipour M., Aklamli M., The study of drug permeation through natural membranes, International Journal of Pharmaceutics, vol. 327, pp. 6–11, 2006
144. Ng SF., Rouse J., Sanderson F.D., Eccleston G.M., A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells, Pharmaceutics, vol. 2, pp. 209–223, 2010
145. Jung Y.J., Yoon JH., Kang N.G., Park S.G., Jeong S.H., Diffusion properties of different compounds across various synthetic membranes using Franz-type diffusion cells, Journal of Pharmaceutical Investigation, vol. 42, pp. 271–277, 2012
146. Ng SF., Rouse J., Sanderson F.D., Eccleston G.M., The Relevance of Polymeric Synthetic Membranes in Topical Formulation Assessment and Drug Diffusion Study, Arch Pharm Res, vol. 35, pp. 579-593, 2012

147. [http://www.daicel.com/cell\\_ac/en/](http://www.daicel.com/cell_ac/en/), τελευταία πρόσβαση στις 27/3/2017
148. <http://www.gelest.com/product/polydimethylsiloxane-trimethylsiloxy-terminated-1000-cst/>, τελευταία πρόσβαση στις 27/3/2017
149. Hamed R., Basil M., AlBaraghthi T., Sunoqrot S., Tarawneh O., Nanoemulsion-based gel formulation of diclofenac diethylamine: design, optimization, rheological behavior and in vitro diffusion studies, *Pharm Dev Technol*, vol. 8, pp. 980-989, 2016
150. [http://www.in-cosmetics.com/\\_novadocuments/255210?v=636053819429970000](http://www.in-cosmetics.com/_novadocuments/255210?v=636053819429970000), τελευταία πρόσβαση στις 27/3/2017
151. Ermakov I.V., Sharifzadeh M., Ermakova M., Gellermann W., Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissue, *J Biomed Opt.*, vol. 10, pp. 1-18, 2005
152. Uchida T., Kadhum W.R., Kanai S., Todo H., Oshizaka T., Sugibayashi K., Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 67, pp. 113–118, 2015
153. Hadgraft J., Lewis D., Beutner D., Wolff H.M., In vitro assessments of transdermal devices containing nitroglycerin, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 73, pp. 125-130, 1991
154. Roberts M.E., Mueller K.R., Comparisons of in vitro nitroglycerin (TNG) flux across yucatan pig, hairless mouse, and human skins, *Pharm Res.*, vol. 7, pp. 673-676, 1990
155. Tambwekar K.R., Kakariya R.B., Garg S., A validated high performance liquid chromatographic method for analysis of nicotine in pure form and from formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 32, pp. 441–450, 2003
156. [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Strat-M-Membrane-for-Transdermal-Diffusion-Testing,MM\\_NF-C112892](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Strat-M-Membrane-for-Transdermal-Diffusion-Testing,MM_NF-C112892), τελευταία πρόσβαση στις 4/4/2017

157. Hardikar S., Bhosale A.V., Budhawant R.N., Establishment of in vivo - in vitro Correlation: a Cogent Strategy in Product Development Process, Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, vol. 48, pp. 66-73, 2014
158. Lavipharm HELLAS A.E. (Paiania, Athens, Greece)
159. Fant R.V., Henningfield J.E., Shiffman S., Strahs K.R., Reitberg D.P., A pharmacokinetic crossover study to compare the absorption characteristics of three transdermal nicotine patches, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, vol. 67, pp. 479-482, 2000
160. Benowitz N.L., Pharmacokinetic considerations in understanding nicotine dependence, Ciba Found Symp., vol. 152, pp. 186-200, 1990
161. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nicotine#section=Solubility>,  
τελευταία πρόσβαση στις 27/3/2017